

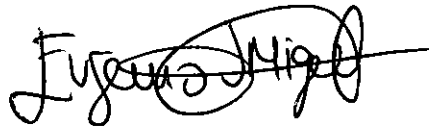
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR I

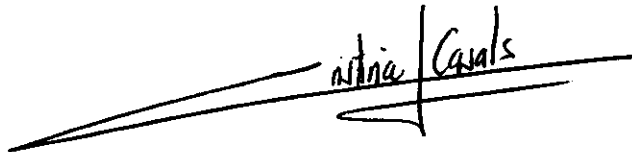
# **INTERACCIONES LIPIDO-PROTEINA EN EL COMPLEJO LIPOPROTEICO DEL SURFACTANTE PULMONAR**

Memoria presentada para la obtención  
del grado de Doctor en Ciencias Biológicas



Eugenio José Miguel Casado

Vº Bº



Director: Dra Cristina Casals Carro

Madrid, Mayo de 1994

*A mis padres y a mi hermana. Sin  
vosotros, sin vuestro cariño y  
apoyo moral, hubiese sido muy  
difícil la realización de este  
trabajo.*

La presente investigación se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Cristina Casals Carro.

Este trabajo se ha financiado con cargo al proyecto PM89-0037 de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica y por el Ministerio de Educación y Ciencia a través de una beca del Plan de Formación de Personal Investigador.

*Quisiera expresar mi agradecimiento a la Dra. Cristina Casals, por darme la oportunidad de iniciarme en la investigación, por su dirección a lo largo de estos años, y por los consejos y enseñanzas recibidos.*

*Mi sincera gratitud al Dr. José G. Gavilanes Franco como Director del Departamento, por las facilidades dadas para la realización del trabajo, así como por su discusión crítica de algunos resultados de esta memoria.*

*También quiero agradecer el apoyo prestado por la gente de mi grupo, especialmente por Jesús Pérez Gil y Miguel Luis Fernández Ruano, que han participado en la realización de algunos experimentos. Al resto de compañeros del Laboratorio y del Departamento agradezco el agradable ambiente de trabajo, así como la colaboración prestada en numerosas ocasiones.*

*Quiero dejar constancia de mi gratitud al Profesor L.M.G. van Golde y al Dr. H.P. Haagsman, de la Universidad de Utrecht, por su amable cesión de la SP-A humana, así como por su discusión crítica de los resultados.*

*Al Dr. Jordi Hernández, de la Universidad Central de Barcelona por el análisis del tamaño de las vesículas mediante dispersión láser.*

*Por último quiero mencionar a Alvaro, Andrés, Carlos y Manuel, por los buenos momentos vividos con ellos durante tantos años, y sobre todo, por su amistad.*



## ABREVIATURAS UTILIZADAS

AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
CoA	Coenzima A
DRC	Dominio de reconocimiento de carbohidratos
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
DMPG	Dimiristoilfosfatidilglicerol
DPH	1,6-Difenil-1,3,5-hexatrieno
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPG	Dipalmitoilfosfatidilglicerol
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
LBA	Lavado broncoalveolar
LPC	Lisofosfatidilcolina
MBP	Proteína del suero que une manosa
NBD-PC	Nitrobenzodiazofosfatidilcolina
NBD-PE	Nitrobenzodiazofosfatidiletanolamina
NBD-PG	Nitrobenzodiazolfosfatidilglicerol
NATA	N-acetil-triptofanamida
OGP	N-Octil- $\beta$ -D-glucopiranosido
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PI	Fosfatidilinositol
PMFS	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
POPG	Palmitoiloleilfosfatidilglicerol
PS	Fosfatidilserina
RH-PE	N-(lisamina rodamina B sulfonil)-fosfatidiletanolamina
SDS	Dodecilsulfato sódico
SM	Esfingomielina
TPA	4 $\beta$ forbol 12 $\beta$ miristato 13 $\text{O}$ acetato

**INDICE**

<b>1. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. LOCALIZACION DEL SURFACTANTE PULMONAR. ASPECTOS HISTOFISIOLOGICOS DE LA UNIDAD ALVEOLO-CAPILAR .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. COMPOSICION DEL SURFACTANTE PULMONAR .....</b>	<b>6</b>
1.2.1. Composición lipídica .....	7
1.2.2. Composición proteica .....	8
<b>1.3. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LAS PROTEINAS DEL SURFACTANTE PULMONAR .....</b>	<b>9</b>
1.3.1. Proteínas hidrofílicas .....	9
1.3.1.1. Colectinas. Características generales .....	9
1.3.1.2. SP-A .....	12
1.3.1.2.1. Estructura de la SP-A .....	12
1.3.1.2.2. Propiedades de la SP-A .....	15
1.3.1.2.3. Funciones de la SP-A .....	17
1.3.1.3. SP-D .....	18
1.3.1.3.1. Estructura de la SP-D .....	18
1.3.1.3.2. Propiedades de la SP-D .....	21
1.3.1.3.3. Funciones de la SP-D .....	22
1.3.2. Proteínas hidrofóbicas .....	23
1.3.2.1. SP-B .....	23
1.3.2.1.1. Estructura de la SP-B .....	23
1.3.2.1.2. Propiedades de la SP-B. Unión a lípidos .....	25
1.3.2.1.3. Funciones de la SP-B .....	27
1.3.2.2. SP-C .....	28
1.3.2.2.1. Estructura de la SP-C .....	28
1.3.2.2.2. Propiedades de la SP-C. Unión a lípidos .....	30
1.3.2.2.3. Funciones de la SP-C .....	32
<b>1.4. SIGNIFICADO FISIOLOGICO DEL SURFACTANTE PULMONAR .....</b>	<b>34</b>
1.4.1. Factor antiatlectásico .....	34
1.4.1.1. El surfactante como agente reductor de la tensión	

superficial .....	35
1.4.1.2. Estabilidad de la monocapa .....	36
1.4.1.3. Adsorción de los fosfolípidos a la interfase .....	37
1.4.2. Participación del surfactante en la homeostasis del líquido alveolar .....	38
1.4.3. Participación en la defensa alveolar .....	39
1.4.3.1. Interacción con los macrófagos alveolares .....	39
1.4.3.2. El surfactante pulmonar como agente inmunosupresor ....	42
<b>1.5. CICLO METABOLICO DEL SURFACTANTE PULMONAR .....</b>	<b>43</b>
1.5.1. Biosíntesis del surfactante pulmonar .....	43
1.5.1.1. Biosíntesis de lípidos .....	44
1.5.1.2. Biosíntesis y procesamiento de las proteínas .....	46
1.5.2. Ensamblaje en los cuerpos lamelares .....	52
1.5.3. Secreción del surfactante pulmonar .....	54
1.5.3.1. Estimulación de la secreción por mediadores químicos locales .....	54
1.5.3.2. Estimulación por factores mecánicos .....	57
1.5.3.3. Inhibición de la secreción por mediadores químicos locales .....	57
1.5.3.4. Inhibición por la SP-A .....	57
1.5.4. Metabolismo extracelular .....	58
1.5.5. Recaptura y reutilización del surfactante pulmonar .....	60
 <b>2. OBJETIVOS .....</b>	 <b>64</b>
 <b>3. MATERIALES Y METODOS .....</b>	 <b>66</b>
 3.1. MATERIALES .....	 67
 3.2. AISLAMIENTO DEL SURFACTANTE PULMONAR Y PURIFICACION DEL SURFACTANTE CONTAMINADO POR COMPONENTES PLASMATICOS .....	   68

<b>3.3. CUANTIFICACION DE LAS PROTEINAS Y FOSFOLIPIDOS</b>	
<b>DEL SURFACTANTE</b>	70
3.3.1. Valoración de proteínas	70
3.3.2. Determinación cuantitativa de fosfolípidos	70
<b>3.4. AISLAMIENTO DE LAS PROTEINAS ESPECIFICAS DEL</b>	
<b>SURFACTANTE</b>	71
3.4.1. Aislamiento de la SP-A	71
3.4.2. Aislamiento de las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C	73
<b>3.5. ANALISIS Y CUANTIFICACION DE LAS PROTEINAS</b>	
<b>DEL SURFACTANTE</b>	75
3.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS	75
3.5.1.1. SP-A	75
3.5.1.2. SP-B y SP-C	76
3.5.2. Cuantificación de las proteínas del surfactante pulmonar	76
<b>3.6. ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y DE MODIFICACION</b>	
<b>QUIMICA DE LA SP-A</b>	77
3.6.1. Espectros de fluorescencia	77
3.6.2. Espectos de dicroísmo circular	78
3.6.3. Composición de aminoácidos	78
3.6.4. Desglicosilación de la SP-A	79
<b>3.7. CAMBIOS ESTRUCTURALES INDUCIDOS POR CALCIO,</b>	
<b>FUERZA IONICA Y PH ACIDO</b>	80
3.7.1. Estudios de autoagregación dependiente de calcio,	
fuerza iónica o pH ácido	80
3.7.1.1. Cinética	80
3.7.1.2. Titulación con calcio	80
3.7.2. Estudios espectroscópicos	81
3.7.2.1. Espectros de fluorescencia	81
3.7.2.1.1. Variación de la intensidad de	
fluorescencia en función de la	
concentración de calcio y cloruro	



4.1.4.	Espectros de fluorescencia de la SP-A .....	94
4.1.5.	Espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano .....	96
4.1.6.	Sumario .....	97
<b>4.2.</b>	<b>EFFECTO DEL MEDIO IONICO EN LA ESTRUCTURA DE LA SP-A .....</b>	<b>98</b>
4.2.1.	Introducción y objetivos .....	98
4.2.2.	Autoagregación de la SP-A dependiente de calcio, o del incremento de fuerza iónica .....	99
4.2.3.	Susceptibilidad a la hidrólisis por tripsina de la forma agregada y no agregada de la SP-A de cerdo .....	103
4.2.4.	Requerimiento de las cadenas oligosacáridas de la SP-A para la autoagregación de la SP-A dependiente de calcio .....	105
4.2.5.	Cambios estructurales inducidos por concentraciones micromolares de calcio .....	108
4.2.6.	Cambios estructurales producidos en la SP-A como consecuencia de la autoagregación de la proteína .....	114
4.2.6.1.	Efecto de concentraciones milimolares de calcio .....	114
4.2.6.2.	Efecto de la fuerza iónica .....	121
4.2.7.	Efecto del pH ácido sobre la estructura de la SP-A .....	128
4.2.7.1.	Autoagregación de la SP-A a pH ácido .....	128
4.2.7.2.	Cambios estructurales en la forma agregada de SP-A a pH ácido .....	130
4.2.8.	Sumario .....	136
<b>4.3.</b>	<b>ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS LIPIDOS SOBRE LA SP-A.</b>	
	<b>SELECTIVIDAD DE LA SP-A FRENTE A VESICULAS LIPIDICAS .....</b>	<b>138</b>
4.3.1.	Introducción y objetivos .....	138
4.3.2.	Efecto de los lípidos sobre la estructura de la SP-A .....	139
4.3.3.	Efecto de la naturaleza del grupo polar y cadena de acilo de los fosfolípidos sobre la fluorescencia intrínseca de la SP-A .....	145
4.3.4.	Estudio de la fuerza iónica en la interacción lípido/SP-A .....	150
4.3.5.	Efecto del estado físico de los lípidos en la interacción .....	151
4.3.6.	Sumario .....	155

**4.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SP-A SOBRE LOS FOSFO-  
LIPIDOS. AGREGACION DE VESICULAS LIPIDICAS**

<b>INDUCIDA POR LA SP-A</b> .....	<b>157</b>
4.4.1. Introducción y objetivos .....	157
4.4.2. Estudio de la agregación de vesículas lipídicas inducida por la SP-A .....	158
4.4.3. Requerimiento de calcio .....	161
4.4.4. Relación lípido/proteína saturante .....	164
4.4.5. Requerimiento de las cadenas oligosacáridas .....	166
4.4.6. Influencia de la temperatura sobre la agregación de vesículas inducida por la SP-A .....	172
4.4.7. Influencia de la fuerza iónica sobre la agregación de vesículas inducida por la SP-A .....	177
4.4.8. Agregación de vesículas a pH ácido .....	177
4.4.9. Agregación de complejos lípido-proteína hidrofóbica .....	182
4.4.10. Sumario .....	185

**5. CONCLUSIONES** ..... **187**

**6. BIBLIOGRAFIA** ..... **191**



## **ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS**

## 1.1. LOCALIZACION DEL SURFACTANTE PULMONAR. ASPECTOS HISTOFISIOLOGICOS DE LA UNIDAD ALVEOLO-CAPILAR

Para mantener sus procesos metabólicos, los animales superiores requieren oxígeno molecular. El aparato respiratorio se encarga de la captación de oxígeno y la eliminación de anhídrido carbónico, que son transportados hacia y desde los tejidos del organismo por el sistema circulatorio.

Los órganos encargados del intercambio gaseoso son los pulmones. Cada pulmón se organiza siguiendo un sistema de vías aéreas que se origina por bifurcación de la tráquea. Esta se ramifica progresivamente originando conductos de un calibre cada vez menor, hasta los bronquiolos respiratorios, que terminan en unas pequeñas cavidades: los alveolos pulmonares. Estos son los únicos puntos donde se produce el intercambio gaseoso. Para la eficacia de este proceso se expone una gran superficie en contacto con la atmósfera. El pulmón humano posee 300 millones de alveolos que dan cuenta de una superficie total de 140 m<sup>2</sup> (Gehr et al., 1978). Además, la organización anatómica de los alveolos debe estar adaptada al establecimiento de un íntimo contacto entre la luz alveolar y los capilares. Por ello, la barrera alveolo-capilar constituye una fina membrana que permite la rápida difusión de los gases, al mismo tiempo que impide la liberación de agua y solutos hacia la luz alveolar. Está constituida por tres capas: una epitelial; una intersticial, intermedia, y una interna endotelial (Figura 1).

El **lado endotelial** de la barrera alveolo-capilar está constituido por un endotelio capilar, estructural y funcionalmente idéntico al endotelio vascular del resto del organismo.

La **capa intersticial** está formada en el 50% de la superficie alveolar por una simple lámina basal de tipo fibroso, situada entre los neumocitos tipo I y las células endoteliales de los capilares (Burri, 1985). En esta zona se produce el intercambio gaseoso. En el resto del alveolo, la capa intersticial está más engrosada, especialmente en los septos. En estas zonas, la capa intersticial se compone de un tejido conectivo fibroso compuesto por una matriz de fibras elásticas y de colágeno, fibronectina y proteoglicanos. Existen células de

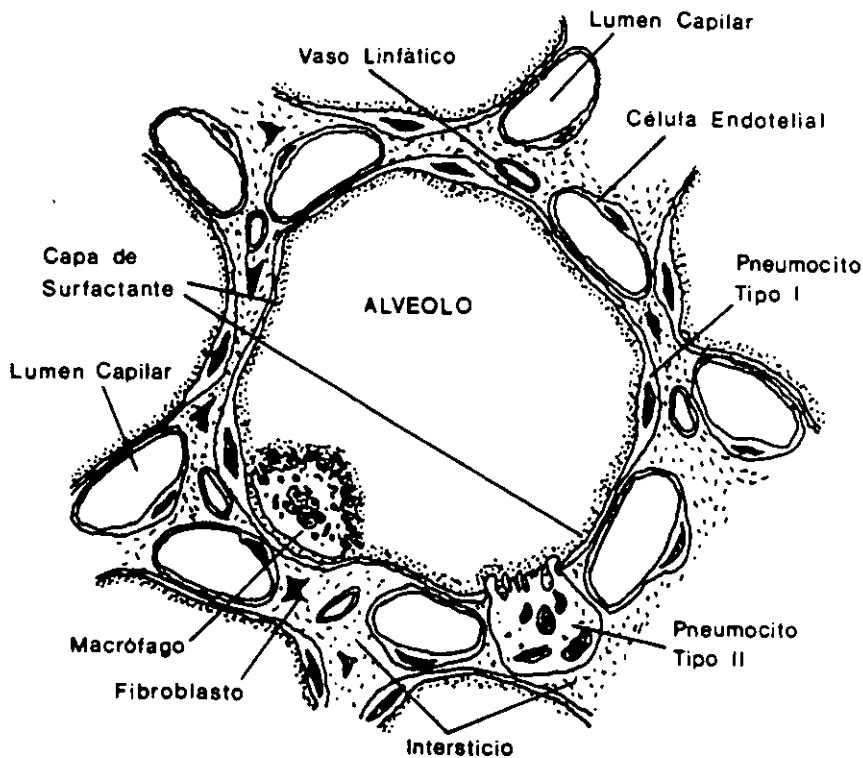


FIGURA 1. Sección transversal de un alveolo.

origen mesenquimático (fibroblastos, miofibroblastos y pericitos), células inmunitarias (linfocitos T) e inflamatorias (macrófagos intersticiales y células de Langerhans). (Para revisión ver Weibel y Crystal, 1991).

El lado epitelial de la barrera está formado por dos tipos celulares, los **neumocitos tipo I** y los **neumocitos tipo II**, que están recubiertos por una capa acuosa que contiene una sustancia de naturaleza lipoteica, denominada **surfactante pulmonar**. La función principal del surfactante pulmonar es reducir la tensión superficial del líquido que recubre la superficie alveolar cuando se reduce el área del alveolo durante la espiración. Si este complejo lipoproteico, capaz de modificar la tensión superficial, no estuviese presente se desarrollarían, según la ley de Laplace  $P = 2T/r$  que relaciona la presión de apertura de las cámaras (P) con la tensión superficial (T) y el radio del alveolo (r), considerables diferencias

de presión entre alveolos de distinto tamaño, lo que conduciría al colapso de los más pequeños durante la espiración.

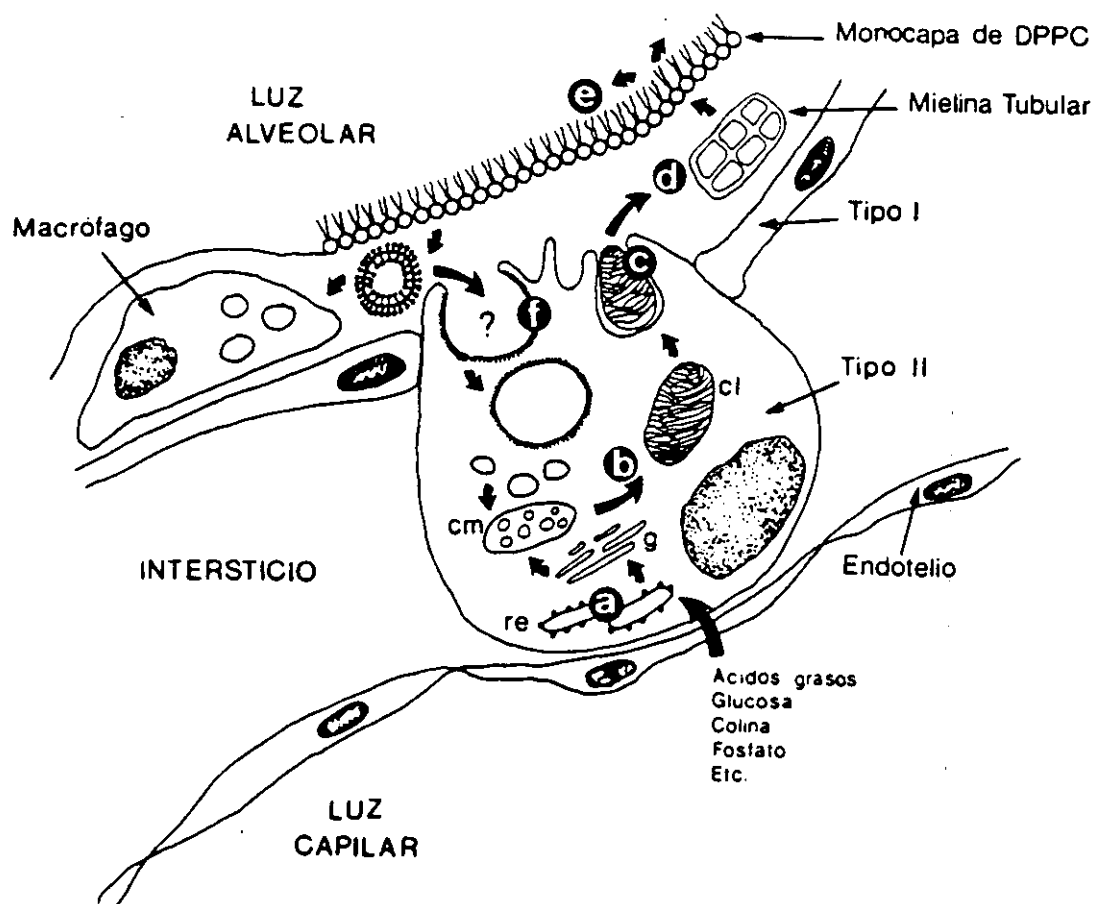
Para desempeñar su función el surfactante se dispone como una monocapa en la interfase aire-líquido. Cuando, durante el ciclo respiratorio, disminuye el área del alveolo, aumenta la concentración de este agente tensoactivo en la interfase, alcanzando valores mínimos de tensión superficial e impidiendo que el alveolo colapse.

Con respecto a los dos tipos de células epiteliales, los neumocitos tipo I son células planas, con núcleo pequeño y extensiones citoplasmáticas de gran tamaño. Cubren entre un 90 y un 95% de la superficie alveolar, a pesar de que sólo son el 7% de las células del septo alveolar. Su misión es facilitar el intercambio gaseoso, reduciendo la distancia entre la luz alveolar y los capilares. En su interior presentan pocas mitocondrias, algunas cisternas del retículo endoplasmático con ribosomas y escaso aparato de Golgi. Se pueden observar vesículas pinocíticas que pueden transportar pequeñas cantidades de albúmina e inmunoglobulinas hacia el espacio alveolar. Los neumocitos tipo I son células totalmente diferenciadas que han perdido la capacidad de dividirse (Schneeberger, 1991).

Los neumocitos tipo II son células cúbicas que se localizan en las uniones de los septos alveolares. Constituyen el 15% de las células del septo alveolar, pero no cubren más del 10% de la superficie alveolar. Son células metabólicamente muy activas. El rasgo más característico de estas células es la presencia de los **cuerpos lamelares**. Estos orgánulos constituyen el almacén intracelular del surfactante pulmonar. Contienen múltiples bicapas de fosfolípidos rodeadas de una membrana limitante. Los cuerpos lamelares contiene proteínas específicas del surfactante. Aunque la función principal de los neumocitos tipo II es la síntesis y secreción del surfactante pulmonar, estas células intervienen en el metabolismo de agentes xenobióticos, en la regulación del equilibrio hídrico transepitelial y en el mantenimiento del epitelio alveolar, por su capacidad de proliferar y diferenciarse en neumocitos tipo I cuando estas células se ven afectadas por cualquier tipo de lesión pulmonar. (Para revisión, ver Mason y Williams, 1991).

Los neumocitos tipo II sintetizan y secretan a la luz alveolar el surfactante pulmonar. El ciclo biológico de este complejo lipoproteico (Figura 2) se inicia con la síntesis de sus componentes en el retículo endoplasmático de estas células. Algunos de estos componentes se procesan, posiblemente en el aparato de Golgi, y posteriormente se almacenan en los

cuerpos lamelares en forma de bicapas lipídicas altamente empaquetadas y rodeadas de una membrana limitante. El contenido de los cuerpos lamelares se secreta por exocitosis a la luz alveolar, donde sufre una serie de modificaciones que alteran sus propiedades bioquímicas y morfológicas. En una primera etapa, el contenido de los cuerpos lamelares recién



**FIGURA 2. Ciclo metabólico del surfactante pulmonar.**

a) Síntesis en el retículo endoplasmático. b) Formación de los cuerpos lamelares. c) Secreción. d) Formación de la mielina tubular. e) Formación de la monocapa en la interfase aire-líquido alveolar. f) Recaptura. (cl) Cuerpos lamelares. (cm) cuerpos multivesiculares. (g) Aparato de Golgi.

secretados adquiere una estructura característica del surfactante: la **mielina tubular**. Mediante microscopía electrónica se ha identificado a la mielina tubular como una red de

túbulos de secciones cuadradas constituidos por bicapas lipídicas (Williams, 1977, 1978). Esta forma extracelular parece ser precursora de la monocapa que se dispone en la interfase aire-líquido, responsable de las propiedades tensoactivas del complejo. Esta monocapa está enriquecida en dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) mediante un proceso de inserción selectiva y/o exclusión selectiva de otros componentes durante la contracción y expansión del alveolo debida al ciclo respiratorio. También se observan en el alveolo vesículas uni y multilamelares. La eliminación del surfactante de la luz alveolar se produce mediante fagocitosis por los macrófagos alveolares o bien por endocitosis por los neumocitos tipo II.

En el espacio alveolar existen macrófagos alveolares. Son las células no parenquimáticas más abundantes del pulmón. Realizan una función clave en la defensa alveolar a través de su capacidad de eliminar partículas extrañas y microorganismos. Asimismo, funcionan como células accesorias en la respuesta inmune. Derivan de monocitos que salen de los capilares, entran en el intersticio, donde se multiplican, y finalmente migran hacia la luz alveolar (Crystal, 1991).

## 1.2. COMPOSICION DEL SURFACTANTE PULMONAR

Bajo la denominación de surfactante pulmonar se incluye una fracción intracelular constituida por los cuerpos lamelares y una fracción extracelular que se puede recuperar mediante lavado broncoalveolar. Esta última es heterogénea. Mediante centrifugación diferencial (Thet et al., 1979; Magoon et al., 1983; Baritussio et al., 1984) o en gradiente de densidad (Gross y Narine, 1989) se recuperan vesículas fosfolipídicas, mielina tubular y cuerpos lamelares recién secretados. Los resultados obtenidos indican que todas ellas tienen una composición lipídica semejante (Magoon, 1983) y se diferencian en la composición proteica (Wright et al., 1984).

Los estudios de composición se han realizado utilizando como material de partida a) lavados broncoalveolares, b) cuerpos lamelares aislados a partir de homogeneizados de pulmón, c) material secretado por el pulmón fetal al líquido amniótico y d) material secretado por neumocitos tipo II al medio de cultivo.

### 1.2.1. COMPOSICION LIPIDICA

El 90% del peso del surfactante pulmonar está constituido por lípidos (Whitsett, 1991; Wright y Clements, 1987). De ellos más del 80% son fosfolípidos (Jobe e Ikegami, 1987; Bambang-Oetomo et al., 1988), y especialmente fosfatidilcolina (PC), que constituye aproximadamente un 80% de los mismos (Tabla I). (Wright y Clements, 1987). La mayor parte de este fosfolípido es DPPC, de manera que esta especie molecular disaturada constituye entre un 40 y un 45% del peso del surfactante. (Schlame et al., 1988; Casals et al., 1990; Van Golde y Casals, 1991). Las PCs insaturadas constituyen aproximadamente el 25% de los fosfolípidos del surfactante. Son principalmente formas monoenoicas en las que en las posiciones sn-1 y sn-2 aparecen en mayor medida los ácidos palmítico y oleico (Schlame et al., 1988).

El fosfatidilglicerol (PG) aparece en un porcentaje elevado de los fosfolípidos del surfactante, aproximadamente en un 10% (King, 1984). Esta clase de fosfolípidos es escasa en las membranas biológicas. Usualmente aparece en cantidades inferiores al 2% (White, 1973). En algunas especies como mono Rhesus (Egberts et al., 1987), pollo (Hylka y Doneen, 1982), tortuga (Lau y Keough, 1981) o sapo (Goñi et al., 1981) se encuentra en cantidades muy pequeñas o prácticamente ausentes. En estos animales el surfactante pulmonar contiene una cantidad equivalente de fosfatidilinositol (PI). La administración de inositol a conejos causa una elevación en el contenido de PI, acompañada con una disminución paralela en el contenido de PG sin que esta variación produzca ninguna alteración en la función del surfactante (Beppu et al., 1983). Ambos fosfolípidos son ácidos, lo que indicaría que, o bien la presencia de cargas negativas, o la existencia de grupos hidroxilo, podrían ser requerimientos estructurales para el establecimiento de interacciones moleculares en el surfactante.

Las otras clases de fosfolípidos se encuentran en proporciones menores. Así la fosfatidiletanolamina (PE) constituye el 3% de los fosfolípidos del surfactante extracelular. La proporción es algo mayor en los cuerpos lamelares, probablemente como consecuencia de la existencia de una membrana limitante en estos orgánulos (Van Golde y Casals, 1991). La fosfatidilserina (PS) y la esfingomielina (SM) constituyen aproximadamente el 3 y el 4% de los fosfolípidos del surfactante, respectivamente. Otros fosfolípidos como lisofosfolípidos y alquilacil y alquenilacil fosfolípidos, se encuentran en un porcentaje menor. Los lípidos neutros como colesterol y ácido palmítico constituyen un 10% de la masa del surfactante.

Otros lípidos neutros como diglicéridos y triglicéridos se encuentran en muy baja proporción.

**TABLA I: COMPOSICION FOSFOLIPIDICA DEL SURFACTANTE EXTRACELULAR AISLADO DE DISTINTAS ESPECIES DE MAMIFEROS**

LIPIDO	% DE FOSFOLIPIDOS TOTALES						
	CERDO <sup>a</sup>	CONEJO <sup>b</sup>	GATO <sup>c</sup>	HOMBRE <sup>c</sup>	MONO <sup>d</sup>	PERRO <sup>a</sup>	RATA <sup>c</sup>
PC	79	86.1	86.3	80.5	83.2	78	82
PG	3	4.6	2.1	9.1	1.4	5	9
PE	8	2.9	3.2	2.3	2.1	9	3
SM	3	0.4	8.4 <sup>2</sup>	8.1 <sup>2</sup>	1.3	4	2
PI	4 <sup>1</sup>	4.5 <sup>1</sup>			10.3	2	4 <sup>4</sup>
PS					1.8 <sup>3</sup>	1	
otros	3	1.5				5	

PC, fosfatidilcolina; PG fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; SM, esfingomielina; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina.

<sup>1</sup> PI + PS, <sup>2</sup> SM + PI + Ps + otros, <sup>3</sup> PS + otros, <sup>4</sup> PI + PS + otros.

<sup>a</sup> Harwood y Richards, 1985. <sup>b</sup> Casals et al., 1990. <sup>c</sup> Shelley et al., 1984. <sup>d</sup> Egberts et al., 1987.

<sup>e</sup> Schlame et al., 1988.

## 1.2.2. COMPOSICION PROTEICA

El contenido proteico del surfactante pulmonar varía considerablemente, dependiendo del procedimiento de aislamiento empleado. Las proteínas componen un 10% de la masa del surfactante que se recupera en el lavado broncoalveolar. De ellas, la mitad aproximadamente son proteínas del plasma. Incluyen principalmente albúmina e inmunoglobulinas. El resto, corresponde a proteínas específicas del surfactante pulmonar, que se han clasificado en dos grupos, basándose en su solubilidad en disolventes acuosos:



Hidrofílicas. Denominadas SP-A y SP-D de acuerdo con el criterio establecido por Possmayer (1988). La SP-A constituye entre un 3 y un 4% de la masa del surfactante (Hawgood, 1991). No se conoce de un modo definitivo la cantidad de SP-D presente en el surfactante. Kuroki y colaboradores (1991 a) muestran que la cantidad de SP-D en lavados broncoalveolares de rata es un 12% de la cantidad de SP-A en las mismas muestras. De acuerdo con estos resultados, es probable que la cantidad de SP-D en el surfactante sea inferior al 0.5%. La SP-A y la SP-D son proteínas que, por presentar una región semejante al colágeno y otra región homóloga a las lectinas de tipo C se han incluido en una familia de proteínas denominadas colectinas (Drickamer et al., 1986).

Hidrofóbicas. Denominadas SP-B y SP-C, de acuerdo con el mismo criterio. Son insolubles en disolventes acuosos y se extraen con los lípidos del surfactante en la fase orgánica. Son proteínas pequeñas que proceden de precursores de mayor tamaño. Se ha estimado que constituyen aproximadamente un 1-2% de la masa del surfactante.

### **1.3. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LAS PROTEINAS DEL SURFACTANTE PULMONAR**

#### **1.3.1. PROTEINAS HIDROFILICAS**

##### **1.3.1.1. Colectinas. Características generales**

Las colectinas son un grupo de proteínas relacionadas estructural y funcionalmente. Se caracterizan porque presentan una región N-terminal de secuencia y estructura secundaria semejante al colágeno y una región C-terminal con actividad tipo lectina o asociada al sistema de complemento. Esta familia incluye a las proteínas del surfactante SP-A y SP-D, a las proteínas del suero que unen manosa (MBP), la conglutina bovina y el factor de complemento C1q. En ésta última, el dominio C terminal contiene una región de unión de inmunoglobulinas. En todas las demás proteínas, esta región une carbohidratos en un proceso dependiente de calcio, de acuerdo con su homología con las lectinas de tipo C.

Recientemente se ha aislado y caracterizado una lectina presente en el suero bovino, denominada CL-43, que podría también pertenecer a esta familia (Holmskov et al., 1993).

Todas ellas son proteínas oligoméricas. Las subunidades se ensamblan mediante la asociación de tres cadenas polipeptídicas a través de sus regiones N-terminales para formar una triple hélice de colágeno. En la SP-A, C1q, MBP y congulinina la triple hélice de colágeno presenta un acodamiento por la interrupción de la repetición de la secuencia Gly-X-Y. Las regiones no colagénicas adoptan una estructura globular. En el caso de la SP-A, 6 triples hélices de colágeno se asocian para formar una estructura peculiar que se asemeja a un ramo de flores (Voss et al., 1988; Thiel y Reid, 1989; Sastry y Ezekowitz, 1993), en el que las cabezas globulares asemejarían las flores y las regiones colagénicas los tallos (Figura 3). La congulinina y probablemente la SP-D adoptan una estructura con forma de cruz (Thiel y Reid, 1989; Sastry y Ezekowitz, 1993). Cuatro triples hélices de colágeno se unen por sus regiones N-terminal mientras que los dominios C-terminales se alejan para formar los brazos (Figura 3).

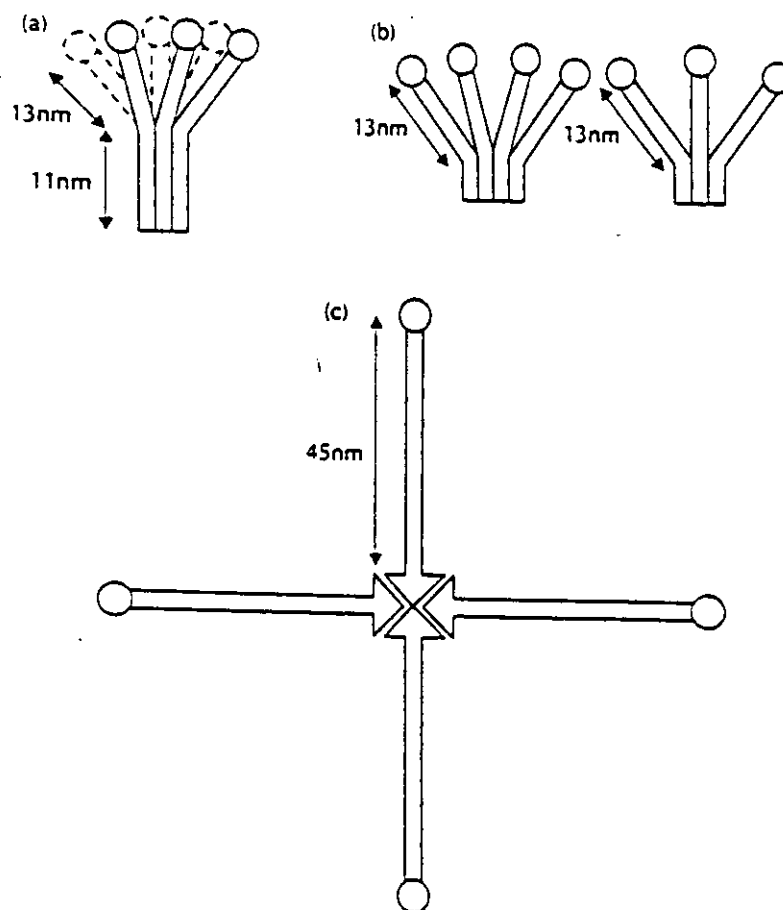
Al menos cuatro colectinas, C1q, MBP, SP-A y congulinina, se unen a un mismo tipo de receptor de membrana plasmática (Malhotra et al., 1990), una glicoproteína de 56 kDa (Malhotra y Sim, 1989). No se ha estudiado hasta el momento la unión de la SP-D (Malhotra et al., 1993).

Este receptor se ha aislado de numerosos tipos celulares, incluyendo linfocitos de amígdala humana, una línea celular de monocitos (Malhotra y Sim, 1989), células endoteliales y plaquetas (Peerschke et al., 1993) y de una línea de neumocitos tipo II (Malhotra et al., 1992).

La unión de C1q, SP-A, congulinina y MBP al receptor se produce a través de la región de colágeno (Malhotra et al., 1993). Estos autores sugieren que la región donde se produce el acodamiento de la triple hélice de colágeno, una zona con abundancia de residuos cargados, podría ser la región implicada en la unión de las colectinas al receptor de colectinas, ya que al incrementarse la fuerza iónica del medio se inhibe el proceso de unión de las proteínas al receptor.

SP-A, SP-D, MBP y congulinina participan en la defensa no inmunitaria frente a agentes patógenos (Sastry y Ezekowitz, 1993). Las colectinas actuarían como puentes entre los agentes infecciosos y las células fagocíticas. A través del dominio de reconocimiento de

carbohidratos se unen a las bacterias o virus y a través del dominio colagénico al receptor de las células fagocíticas (Haurum et al., 1993; Sastry y Ezekowitz, 1993; Haagsman et al., 1994).



**FIGURA 3. Estructura de C1q o SP-A (a), MBP (b) y congulinina (c).**

SP-A y C1q son proteínas hexaméricas constituidas por seis triples hélices de colágeno unidas a un dominio globular. Ambas constan de 18 subunidades. MBP tiene una estructura similar, pero cuando se aísla aparece una población más heterogénea, constituida por trímeros principalmente, tetrámeros y hexámeros. La congulinina es una proteína de mayor tamaño, formada por cuatro protómeros, cada una de ellos con una región colagénica y otra globular. Tomado de Sastry y Ezekowitz, 1993.

### 1.3.1.2. SP-A

#### 1.3.1.2.1. Estructura de la SP-A

El estudio de la estructura primaria de la SP-A pone de manifiesto la presencia de dos dominios estructuralmente diferentes en cada subunidad de la SP-A: un dominio N-terminal, de secuencia y estructura semejante al colágeno, y un dominio C-terminal con actividad de tipo lectina. La masa molecular de cada subunidad de la SP-A se ha determinado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y en condiciones reductoras. Se obtienen valores que oscilan entre 26 y 38 kDa, con puntos isoelectricos entre 4.5 y 5.0. Esta heterogeneidad deriva principalmente del grado de glicosilación de la SP-A. La SP-A está glicosilada en la región C-terminal. Mediante microscopía electrónica se observa que la forma nativa de la SP-A tiene una compleja estructura hexamérica con 6 dominios globulares conectados a un tallo común (Voss et al., 1988). Esta compleja estructura parece estar compuesta por 18 subunidades (Voss et al., 1988; King et al., 1989). En un primer paso del proceso de ensamblaje de la SP-A 3 subunidades se unen para formar una unidad que vamos a denominar protómero, mediante la formación de una triple hélice de colágeno estabilizada por puentes disulfuro intercatenarios (Hass et al., 1991). Parece ser que el dominio globular de cada subunidad podría funcionar como un sitio de nucleación para la formación de la triple hélice en analogía con otros colágenos (Spissinger et al., 1991). En un último paso, la estructura hexamérica de la SP-A se formaría por agregación lateral de las regiones colagénicas de 6 protómeros (Figura 4) de forma semejante a como ocurre con otras colectinas.

Los dominios estructurales de cada subunidad de SP-A presentan las siguientes características (Figura 4):

N-terminal. Incluye un péptido señal de 20 aminoácidos, que se elimina en las etapas iniciales del procesamiento de la proteína. Existe una cisteína en esta región en todas las especies estudiadas que es esencial para la formación de puentes disulfuro intermoleculares (Benson et al., 1985), importantes en el alineamiento de las cadenas, y necesarios para la oligomerización de la proteína madura. En la mayor parte de las especies estos puentes disulfuro son los únicos enlaces covalentes entre las subunidades de la SP-A. Sin embargo, en la proteína humana existen otras

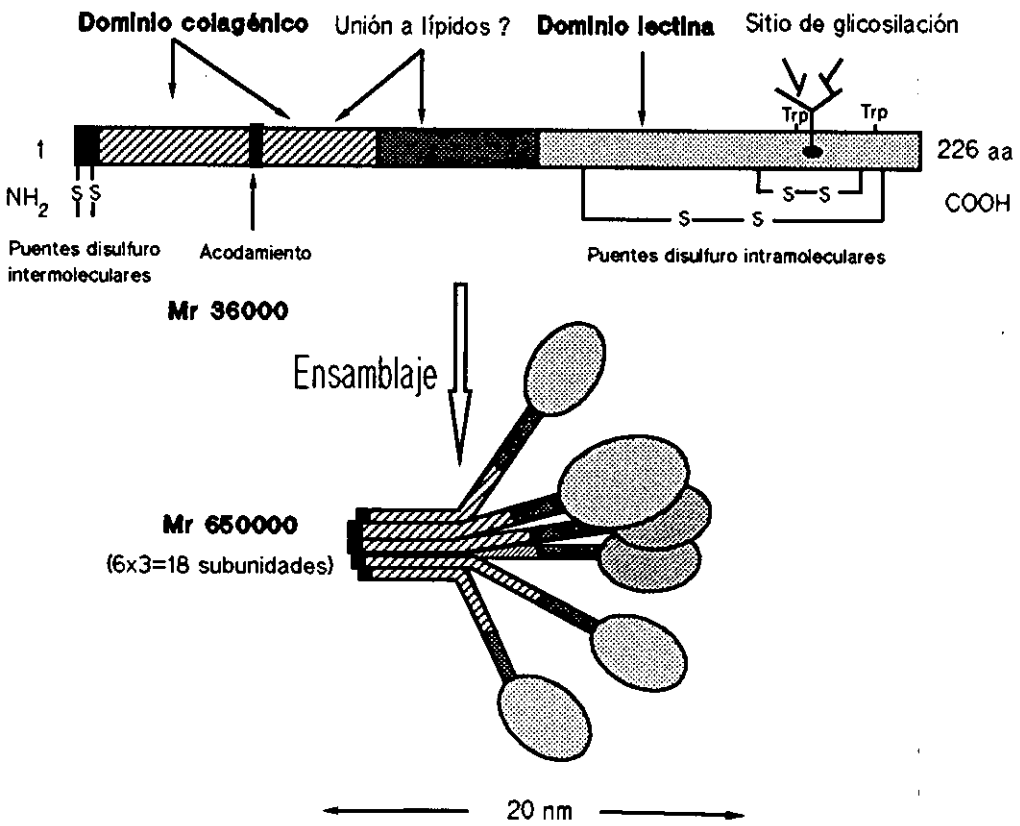
cisteínas en posiciones 67 y 85 que podrían formar puentes disulfuro (Hawgood y Schiffer, 1991). En esta región existe un posible sitio de glicosilación en algunas especies como perro (Benson et al., 1985) y rata (Sano et al., 1987 c). Sin embargo, no existe en la proteína humana (White et al., 1985) o conejo (Hawgood, 1989). La región N-terminal de la proteína de rata se acetila "in vitro" en cultivos de neumocitos tipo II (Weaver et al., 1986). No se sabe si esta modificación ocurre también "in vivo". La modificación no se ha detectado en SP-A de perro (Weaver et al., 1986).

Región semejante al colágeno. Se extiende entre los aminoácidos 8 y 80. Consta de la repetición de 23 triplete Gly-X-Y. La posición Y está ocupada por prolina en 13 de los 23 triplete. En todos, está modificada post-traduccionamente a hidroxiprolina (Hawgood, 1989). Esta región se organiza estructuralmente como una triple hélice de colágeno. Los espectros de dicroísmo circular de la SP-A muestran una banda negativa a 205 nm (Voss et al., 1988; King et al., 1989; Haagsman et al., 1990), que desaparece después del tratamiento con collagenasa bacteriana (Voss et al., 1988; King et al., 1989). Asimismo, el tratamiento de la SP-A con tripsina produce un fragmento resistente a la digestión por esta enzima proteolítica que, cuando se analiza mediante dicroísmo circular, presenta un espectro típico de colágeno (King et al., 1989). Mediante microscopía electrónica de SP-A purificada se observa una estrecha asociación lateral en la mitad N-terminal de la zona colagénica de manera que las 6 triples hélices de colágeno se asocian en la forma madura de la proteína (Voss et al., 1988). La repetición de la secuencia Gly-X-Y se interrumpe después del triplete 13 en la SP-A humana. Mediante microscopía electrónica se visualiza que esta interrupción provoca un acodamiento en la dirección de las triples hélices de colágeno de manera que ya no existe asociación lateral entre ellas (Voss et al., 1988).

Dominio globular. Está formado por los últimos 148 aminoácidos, en el extremo C-terminal de la proteína. Incluye un dominio de reconocimiento de carbohidratos, constituido por los últimos 130 aminoácidos, homólogo con el de otras proteínas que unen a azúcares en presencia de calcio (lectinas tipo C) (Drickamer et al., 1986). En todas estas proteínas, este dominio de reconocimiento de carbohidratos se caracteriza por la presencia de 18 residuos invariables, entre ellos 4 cisteínas. En la SP-A la cisteína de la posición 135 se une mediante puente disulfuro a la de posición 226. Igualmente ocurre con las de posiciones 204 y 218 ( Haagsman et al., 1989; Ross

et al., 1991). Esta región de la SP-A está glicosilada en la asparagina de la posición 198 (Hawgood, 1989). Los azúcares unidos en esta posición a la SP-A de rata se sulfatan en cultivos de neumocitos tipo II (Weaver et al., 1987). La incorporación de restos de ácido siálico también contribuye a la heterogeneidad de cargas de la proteína (Hawgood y Schiffer, 1991).

**SP-A**



**FIGURA 4. Dominios estructurales de la SP-A y ensamblaje de los monómeros para formar la estructura oligomérica de la proteína nativa.**

### 1.3.1.2.2. Propiedades de la SP-A

#### A) Unión de azúcares

La SP-A une azúcares en un proceso dependiente de calcio (Haagsman et al., 1987). La unión requiere el mantenimiento de la integridad estructural de la proteína, ya que la reducción y alquilación de la SP-A, la desnaturalización térmica de la triple hélice de colágeno y el tratamiento con colagenasa bacteriana anulan la capacidad de unión de la SP-A a azúcares inmovilizados sobre agarosa (Haagsman et al., 1987).

La selectividad de la unión de distintos azúcares a la SP-A se ha estudiado midiendo la inhibición por distintos azúcares de la unión de SP-A a manano inmovilizado. La SP-A unida al manano se valora mediante técnicas inmunológicas, utilizando anticuerpos anti-SP-A. La SP-A une selectivamente N-acetil-manosamina > L-fucosa, maltosa > D-glucosa > D-manosa (Haurum et al., 1993). Otras colectinas como la conglutinina o MBP en las mismas condiciones muestran mayor afinidad por N-acetil-glucosamina, azúcar que no inhibe la unión de la SP-A a manano (Haurum et al., 1993).

La unión de los azúcares a la SP-A depende de calcio. No se produce unión a concentraciones de calcio inferiores a 10  $\mu$ M. La unión óptima se produce a concentraciones de calcio en el rango 0.1-1 mM (Haurum et al., 1993). En presencia de otros cationes divalentes, como estroncio, y en menor medida bario y manganeso, también se produce unión de azúcares a la SP-A (Haagsman et al., 1987).

#### B) Unión a lípidos

Una de las propiedades más importantes de la SP-A es su capacidad de unir fosfolípidos. La SP-A se coaísila con los lípidos del surfactante, encontrándose por tanto, en el alveolo asociada con ellos (King y McBeth, 1979; 1981).

Los ensayos de unión de la SP-A a vesículas de fosfolípidos se han realizado con  $^{125}$ I-SP-A y/o liposomas marcados con  $^{14}$ C. Los datos de los que se dispone actualmente sobre la interacción de la SP-A con los fosfolípidos son los siguientes:

- Mediante técnicas de centrifugación en gradiente de densidad se ha demostrado que la SP-A se une en mayor medida a vesículas mixtas de DPPC con fosfatidilglicerol. La máxima unión se produce con vesículas de DPPC/DPPG (85:15, en peso) (King et al., 1983). Sin embargo, mediante experimentos de interacción de  $^{125}\text{I}$ -SP-A con fosfolípidos inmovilizados sobre placas de silicagel, Kuroki y Akino (1991) observaron una interacción específica de la SP-A con DPPC y SM. La SP-A no se unía a DPPG en las mismas condiciones. Ambos estudios se realizaron en presencia de calcio.
- Mediante técnicas de sedimentación se ha demostrado que la unión de la SP-A a fosfolípidos es mayor a temperaturas por debajo de la temperatura de transición de fase de los fosfolípidos correspondientes (King et al., 1986).
- La unión de la SP-A a los lípidos requiere el mantenimiento de la integridad estructural de la proteína. El tratamiento con colagenasa bacteriana (Kuroki y Akino, 1991; Ross et al., 1991) o la reducción y alquilación de la proteína (Ross et al., 1991) anula la capacidad de la SP-A de unirse a fosfolípidos.

No se conoce la región de la molécula que interacciona con los fosfolípidos, aunque Ross y colaboradores (1986) sugieren que la región de unión entre el dominio colagénico y el dominio de reconocimiento de carbohidratos, una zona con abundancia de residuos hidrofóbicos que se ajusta al modelo de una hélice anfipática, podría ser la zona implicada.

En cuanto al efecto de la SP-A sobre los fosfolípidos, los datos de los que se dispone son los siguientes:

- Mediante técnicas de espectroscopía infrarroja se ha demostrado que la SP-A no modifica sustancialmente el perfil de transición de fase de vesículas de DPPC/DPPG (85:15, en peso) cuando se utiliza una relación lípido/SP-A (1:1, en peso). A una relación (1:2, en peso) incrementa la temperatura de transición de fase sin afectar a la cooperatividad del proceso, lo que sugiere que la interacción entre la SP-A y los fosfolípidos ocurre, probablemente, por interacciones electrostáticas entre la proteína y la cabeza polar de los mismos (Reilly et al., 1989).



- La SP-A agrega vesículas de fosfolípidos en presencia de calcio (King et al., 1981; Hawgood et al., 1985; Haagsman et al., 1989; Ross et al., 1991). La agregación de vesículas requiere el mantenimiento de la integridad estructural de la SP-A, ya que el tratamiento con colagenasa bacteriana (Haagsman et al., 1989; Ross et al., 1991) y la reducción y alquilación de la SP-A impiden la agregación (Ross et al 1991). La desglicosilación de la SP-A mediante tratamiento con endoglicosidasa F disminuye drásticamente la agregación de vesículas de DPPC/PG de huevo (7:3, en peso) inducida por la SP-A (Haagsman et al., 1991). Estos autores suponen la existencia de un mecanismo de agregación de vesículas basado en la unión de los azúcares de una molécula de SP-A al sitio de unión de azúcares de otra molécula de SP-A, pero no se ha publicado ningún otro trabajo que apoye esta posibilidad. Serán necesarios nuevos estudios para afirmar o descartar la existencia de un mecanismo de agregación de vesículas de este tipo.
- La SP-A no fusiona vesículas lipídicas, pero incrementa la actividad fusogénica de la SP-B, o al menos la capacidad de la SP-B de mezclar el componente lipídico de estas vesículas. El proceso es dependiente de calcio (Poulain et al., 1991).
- La SP-A aumenta la adsorción de extractos lipídicos del surfactante pulmonar, que contienen las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C, en presencia de calcio (Hawgood et al., 1985; Efrati et al., 1987; Chung et al., 1989; Venkitaraman et al., 1990). En ausencia de las proteínas hidrofóbicas, el incremento en la velocidad de adsorción de fosfolípidos provocado por la SP-A es insuficiente para explicar las propiedades del surfactante (King et al., 1983; Yu y Possmayer, 1990).

#### 1.3.1.2.3. Funciones de la SP-A

Desde que se produjo el aislamiento y caracterización de las proteínas del surfactante pulmonar se ha atribuido a dichas proteínas diversas funciones. Existen argumentos que apoyan la participación de las proteínas en prácticamente todas las etapas del ciclo biológico del surfactante, desde el ensamblaje en los cuerpos lamelares, hasta la internación del complejo por los neumocitos tipo II o los macrófagos alveolares (Figura 10). La SP-A es una

proteína oligomérica, y su peculiar estructura le permite unir azúcares, interaccionar con los fosfolípidos y unirse a receptores de membrana de los neumocitos tipo II y macrófagos alveolares. Por tanto, puede establecer gran número de interacciones moleculares que le permiten intervenir en numerosas etapas del ciclo biológico del surfactante (Figura 10):

- Participación en la formación de la mielina tubular. "In vitro" se obtienen figuras semejantes a las de mielina tubular a partir de mezclas de lípidos que contienen DPPC y fosfatidilglicerol, junto con SP-A, SP-B y calcio (Suzuki et al., 1989; Williams et al., 1991).
- Promoción de la adsorción de fosfolípidos a la interfase aire-líquido en presencia de las proteínas hidrofóbicas (Efrati et al., 1987; Hawgood et al 1987; Chung et al., 1989; Cockshutt et al., 1990; Venkitaraman et al., 1990)
- Inhibición de la secreción (Dobbs et al., 1987; Rice et al., 1987) y estimulación de la recaptura del surfactante pulmonar (Wright et al., 1987) por los neumocitos tipo II, probablemente a través de la interacción con un receptor, comportándose como un regulador de la concentración del complejo en el alveolo.
- Participación en la defensa alveolar. Se une, probablemente a través de la interacción con un receptor, a la superficie de los macrófagos alveolares (Wintergerst et al., 1989; Wright et al., 1989; Pison et al., 1992), estimulando su migración e incrementando la fagocitosis de bacterias y virus por estas células (Van Iwaarden et al., 1990; 1992 b;).

Todas estas funciones son dependientes de la unión de calcio a la SP-A.

### 1.3.13. SP-D

#### 1.3.1.3.1. Estructura de la SP-D

La SP-D fue la última proteína específica del surfactante aislada y caracterizada, a partir de medios de cultivo de neumocitos tipo II de rata (Persson et al., 1988), de lavados broncoalveolares de rata (Persson et al., 1989) y humanos (Lu et al., 1992) y de fluido

amniótico humano (Lu et al., 1992). Se trata de un grupo de varias proteínas con un punto isoeléctrico entre 6 y 8 (Persson et al., 1989) con una masa molecular determinada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de 43 kDa en condiciones reductoras y 120-130 kDa en ausencia de agentes reductores (Persson et al., 1988; 1989). El tratamiento de la proteína con endoglicosidasa F o neuraminidasa previo a la realización de la electroforesis reduce la masa molecular aparente a 40 kDa (Persson et al., 1988), lo que indica que la SP-D está glicosilada. La masa molecular de la proteína nativa determinada mediante cromatografía de penetrabilidad es de 620 kDa (Persson et al., 1989; Shimizu et al., 1992).

Se conoce la secuencia de aminoácidos derivada de los correspondientes cDNA para la SP-D de rata (Shimizu et al., 1992), humana (Rust et al., 1991; Lu et al., 1992) y bovina (Lim et al., 1993). De su estudio se puede deducir que presenta una gran homología con la SP-A y otras proteínas pertenecientes al grupo de las colectinas, especialmente con la conglutina. De acuerdo con esa homología con las colectinas, la SP-D une azúcares en presencia de calcio, con una mayor afinidad para  $\alpha$ -D-glucosa.

Al igual que en la SP-A, en la SP-D pueden establecerse varios dominios estructurales (Figura 5):

N-terminal. Está constituido por 25 aminoácidos. Aparecen dos residuos de cisteína en posiciones 15 y 20 que establecen puentes disulfuro intercatenarios. Estas cisteínas están conservadas en todas las especies estudiadas. A esta región le precede un péptido señal (Lu et al., 1992).

Dominio colagénico. Está constituido por 177 aminoácidos en las proteínas humana y de rata (Shimizu et al., 1992; Rust et al., 1991; Lu et al., 1992) y por 171 en la bovina (Lim et al., 1993). Al igual que en la SP-A, está constituido por la repetición de la secuencia Gly-X-Y. 33 residuos de prolina y 12 de lisina aparecen en estas posiciones (Shimizu et al., 1992). El 30% de las prolinas y el 40% de las lisinas están hidroxiladas (Persson et al., 1989). Los primeros 22 aminoácidos de esta región están conservados en todas las proteínas estudiadas (Lim et al., 1993). En esta región colagénica no existe ninguna cisteína. La incubación de la proteína con collagenasa bacteriana produce un fragmento resistente de 20 kDa que retiene la afinidad de unión a los azúcares (Lu et al., 1992; Persson et al., 1988). En este dominio existe un sitio de glicosilación (Rust et al., 1991; Shimizu et al., 1992; Lu et al., 1992; Lim et al., 1993).

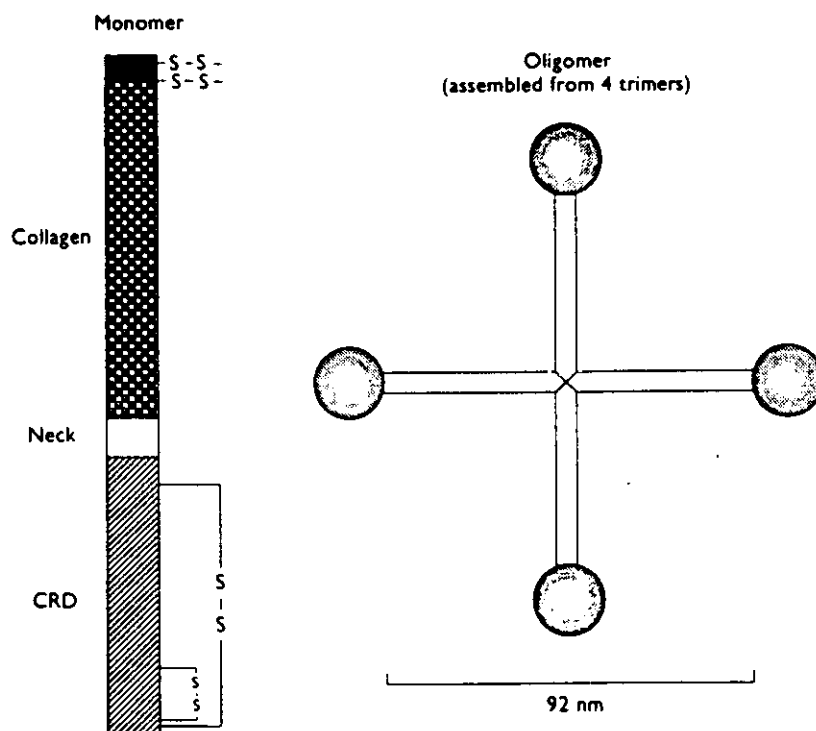


FIGURA 5. Estructura de la SP-D.

Tomado de Haagsman, 1994.

**Dominio C-terminal.** Está formado por 153 aminoácidos en las proteínas estudiadas. La especificidad por los azúcares viene determinada por 17 o 18 residuos conservados en todas las SP-D estudiadas. Entre ellos, cuatro residuos de cisteína en las posiciones 261, 331, 345 y 353 de las proteínas de rata y humana, y 225, 325, 339 y 347 en la bovina (Lim et al., 1993), que forman puentes disulfuro intracatenarios. No se conocen los residuos implicados en la formación de cada puente disulfuro, pero si el patrón fuese similar al observado en otras proteínas de este grupo, incluida la SP-A los puentes disulfuro implicarían a las Cys<sub>261</sub>-Cys<sub>353</sub> y Cys<sub>331</sub>-Cys<sub>345</sub> de las proteínas de rata y humana, y las correspondientes cisteínas de la proteína bovina.

### 1.3.1.3.2. *Propiedades de la SP-D*

#### A) Unión de azúcares

Al igual que las SP-A, MBP y conglutinina, la SP-D une azúcares en presencia de calcio (Persson et al., 1990). La afinidad es mayor para  $\alpha$ -D-glucosa y sacáridos de este azúcar como maltosa, maltotriosa e isomaltosa. También une manosa, galactosa y fucosa. No presenta unión a azúcares aminados. La concentración de calcio necesaria para la unión es muy baja, del orden micromolar. A diferencia de la SP-A, no existe unión de azúcares a la SP-D en presencia de otros cationes divalentes como estroncio, bario o manganeso (Persson et al., 1990)

#### B) Unión a fosfolípidos

A diferencia de las otras proteínas específicas del surfactante pulmonar, no se ha establecido de un modo definitivo la unión de la SP-D a los fosfolípidos. La centrifugación de muestras de lavado broncoalveolar a 33000 x g durante 16 horas permite separar un precipitado en el que se encuentran los lípidos y las proteínas hidrofóbicas y un sobrenadante. Mediante ELISA se detecta que más del 70% de la SP-D presente en el lavado broncoalveolar se encuentra en el sobrenadante, mientras que sólo un 0.9% de la SP-A se encuentra en esa fracción. Por tanto, en el lavado broncoalveolar la SP-D no se encuentra mayoritariamente asociada con los complejos lipoproteicos que forman la SP-A, la SP-B, la SP-C y los fosfolípidos del surfactante (Kuroki et al., 1991 a). Sin embargo, este grupo de investigadores muestra que fracciones de SP-D homogéneas según electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, cuando se analizan mediante cromatografía de alta resolución (HPLC), aparecen como dos picos, uno de los cuales desaparece cuando, previamente a su aplicación en la columna, se somete a las muestras a una extracción con butanol. El análisis de la fracción soluble en butanol mediante cromatografía en capa fina muestra que los lípidos asociados a la SP-D son colesterol, triglicéridos, ácidos grasos y sobre todo fosfolípidos. El principal componente de éstos es fosfatidilcolina y, en general, la composición de los fosfolípidos es semejante a la del surfactante. Dada la semejanza estructural con la SP-A, podría suponerse una interacción con los lípidos semejante a la de la SP-A. Sin embargo, existen diferencias:

- La SP-D no compite con  $^{125}\text{I}$ -SP-A por la unión a DPPC inmovilizada sobre placas de silicagel (Kuroki et al., 1991 a).
- La SP-D no agrega vesículas de DPPC/PC de huevo/PG de huevo (9:3:2 m/m/m) (Kuroki et al., 1991 a).
- La SP-D interacciona de manera específica con PI (Kuroki et al., 1992).

La SP-D une glicolípidos, exclusivamente glucosilceramidas, en presencia de calcio. La SP-D no une galactosilceramidas ni ceramidas. No se produce unión en presencia de otros cationes divalentes (Kuroki et al., 1992).

#### 1.3.1.3.3. *Funciones de la SP-D*

Hasta el momento la única función atribuida a la SP-D es su participación en la defensa alveolar frente a agentes patógenos. Se ha publicado que la SP-D se une a la superficie de los macrófagos alveolares y estimula la producción de radicales superóxido por estas células (Van Iwaarden et al., 1992 a). La SP-D incrementa la fagocitosis de bacterias (Kuan et al., 1992; Crouch et al., 1992), probablemente actuando como puente entre los agentes infecciosos y las células fagocíticas. Hasta el momento, no se ha estudiado la unión de la SP-D al receptor de colectinas, común para C1q, SP-A, MBP y congulinina, ni a ningún otro receptor de membrana.

Los estudios realizados hasta el momento no atribuyen una participación de la SP-D en la organización estructural del surfactante pulmonar. Esta proteína no se encuentra en la mielina tubular ni en los cuerpos lamelares (Crouch et al., 1991, Vorhoout et al., 1992). La extracción selectiva de la SP-D no afecta a los valores de tensión superficial de muestras de surfactante (Persson et al., 1990). A diferencia de la SP-A, no parece alterar la secreción de DPPC por los neumocitos tipo II (Kuroki et al., 1991 b).

## 1.3.2. PROTEINAS HIDROFOBICAS

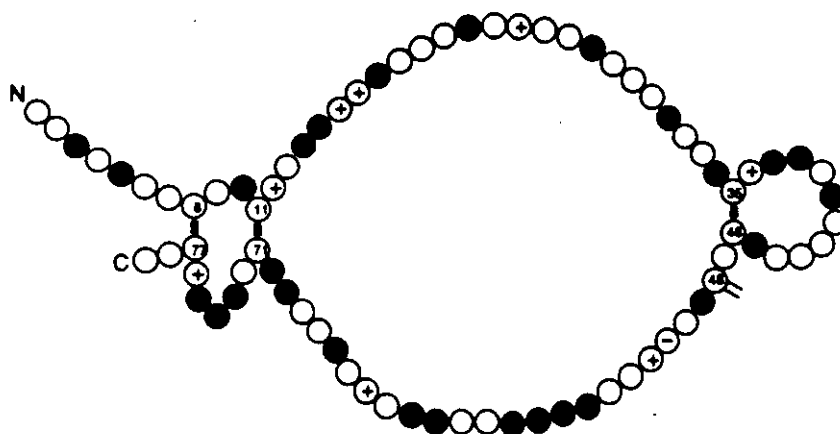
### 1.3.2.1. SP-B

#### 1.3.2.1.1. Estructura de la SP-B

Se conoce la secuencia de la proteína obtenida a partir del cDNA de la SP-B humana (Glasser et al., 1987; Jacobs et al., 1987; Revak et al., 1988), de perro (Hawgood et al., 1987), conejo (Xu et al., 1989), rata (Emrie et al., 1989) y ratón (D'Amore-Bruno et al., 1991).

La forma funcionalmente activa de la SP-B es un péptido de 79 aminoácidos (Curstedt et al., 1988). La masa molecular determinada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS es de 18 kDa en condiciones no reductoras y de 6-9 kDa en ausencia de agente reductor. Del análisis de su secuencia se puede deducir que tiene un alto contenido en aminoácidos hidrofóbicos, dos aminoácidos cargados negativamente y diez u once aminoácidos básicos, por lo que la carga neta del péptido es positiva al pH fisiológico. Contiene 7 cisteínas en la mayor parte de las especies estudiadas. Las posiciones de estos residuos están conservadas. Se ha establecido el patrón de puentes disulfuro intramoleculares (Figura 6) que existen en el péptido humano y en el de cerdo (Johansson et al., 1991 a; 1992): Cys<sub>8</sub>-Cys<sub>77</sub>, Cys<sub>11</sub>-Cys<sub>71</sub> y Cys<sub>35</sub>-Cys<sub>46</sub>. La cisteína de posición 48 establece un puente disulfuro intermolecular con el correspondiente residuo de la misma posición de otra molécula de SP-B, formando un homodímero que es la forma en la que se encuentra la SP-B en la mayor parte de las especies estudiadas (Hawgood et al., 1987).

Utilizando perfiles de hidropatía se ha podido concluir que el péptido presenta al menos dos regiones que son compatibles con la existencia de hélices anfipáticas (Glasser et al., 1987; Takahashi et al., 1990; Waring et al., 1990) que le permitiría interaccionar con la bicapa lipídica. Estudios de espectroscopía infrarroja (Vandenbussche et al., 1992 a) o de dicroísmo circular utilizando tanto SP-B sintética (Morrow et al. 1993 a) como proteína aislada de pulmón de cerdo (Pérez-Gil et al., 1993) muestran que en todos los casos, el péptido presenta entre un 40 y un 45% de  $\alpha$ -hélice en presencia de lípidos.



**FIGURA 6. Representación esquemática de la estructura de la SP-B.**

Los círculos llenos indican aminoácidos hidrofóbicos que se encuentran conservados en las proteínas humana, porcina, canina y de rata. Los puentes disulfuro intracatenarios que se establecen entre los residuos 8 y 77, 11 y 71 y 35 y 46 están también altamente conservados. La SP-B aparece como un homodímero estabilizado por puentes disulfuro intercatenarios que se establecen a través de la cisteína de posición 48 de dos moléculas de SP-B. Tomado de Johansson et al. (1991 a).

La forma madura del péptido procede de un precursor de mayor tamaño. El precursor de la SP-B tiene 381 residuos en la SP-B humana (Jacobs et al., 1987; Pilot-Matías et al., 1989), 362 en la de perro (Hawgood et al., 1987), 376 en la de rata (Emrie et al., 1989), 377 en la de ratón (D'Amore-Bruno et al., 1991) y 370 en la de conejo (Xu et al., 1989). La masa molecular del precursor es de 40-42 kDa determinada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Los primeros 20-25 aminoácidos de este precursor son hidrofóbicos y se ajustan al modelo propuesto para los péptidos señal (Jacobs et al., 1987). Las secuencias que flanquean al péptido maduro son relativamente hidrofílicas y podrían facilitar el tránsito intracelular de la proteína antes de la eliminación de las secuencias flanqueantes y de su posterior secreción. En todas las especies existe un sitio de glicosilación en el extremo C terminal del precursor. El tratamiento con endoglicosidasa F o tunicamicina incrementa la movilidad electroforética del precursor (Weaver y Whitsett,



1989, O'Reilly et al., 1989), lo que indica que el precursor de la SP-B se encuentra realmente glicosilado. A partir de la secuencia del cDNA de la SP-B humana se puede deducir la secuencia del cDNA de la SP-B humana se puede deducir la existencia de un sitio adicional de glicosilación en la región N terminal del precursor (Glasser et al., 1987; Jacobs et al., 1987, Pilot-Matias et al., 1989), aunque no se conoce si la modificación ocurre "in vivo".

Los precursores de la SP-B son proteínas heterogéneas respecto a la carga. Así, el precursor de la SP-B humana es un conjunto de proteínas con puntos isoeléctricos de 5.1-5.4 (O'Reilly et al., 1989).

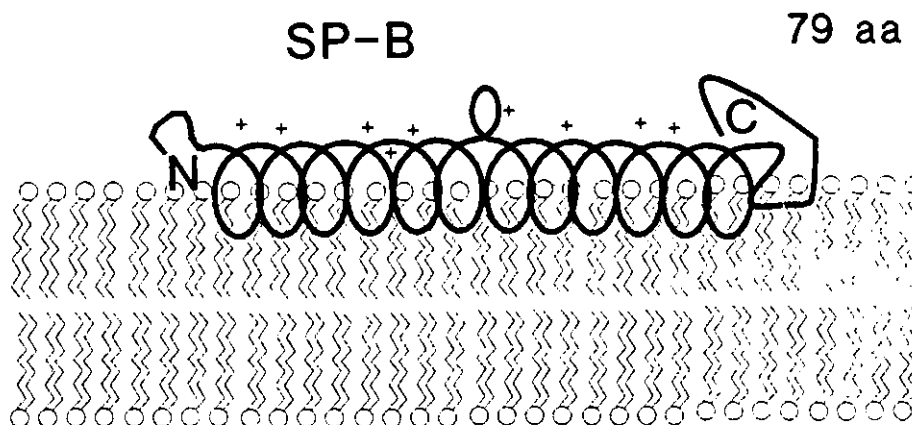
#### *1.3.2.1.2. Propiedades de la SP-B. Unión a lípidos*

La SP-B es una proteína hidrofóbica que se aísla junto con los lípidos en la fase orgánica que resulta de la extracción del surfactante con disolventes orgánicos. Por tanto, se encuentra estrechamente asociada a los lípidos del surfactante y la interacción con ellos modifica sustancialmente algunas propiedades de los lípidos:

- La presencia de SP-B promueve la mezcla del componente lipídico entre vesículas, determinado mediante estudios de transferencia de energía entre vesículas que incluyen PE marcada en su cabeza polar con una sonda fluorescente, nitrobenzoxadiazol (NBD-PE) y vesículas que incluyen PE marcada en su cabeza polar con una molécula aceptora, rodamina (RH-PE) (Poulain et al., 1991). Resultados semejantes se han obtenido mediante la variación de la tasa de emisión de fluorescencia dímero/monómero de sondas de pireno-PC (Oosterlaken-Dijkterhuis et al., 1992). El proceso se produce tanto con vesículas neutras como con vesículas ácidas, aunque la presencia de PG incrementa considerablemente la mezcla del componente lipídico, y lo hace dependiente de calcio (Poulain et al., 1991; Oosterlaken-Dijkterhuis et al., 1992). El efecto sinérgico producido por la SP-A sobre la actividad de la SP-B para inducir la mezcla del componente lipídico entre vesículas de DPPC/DPPG (7:1, mol/mol) (Poulain et al., 1991), podría deberse a la agregación de vesículas inducida por la SP-A en presencia de calcio, que facilite el subsiguiente proceso de fusión o a través de interacciones entre la SP-A y la SP-B, hasta el momento no demostradas.

- Mediante la utilización de sondas fluorescentes como ácido trans-parinárico, ácido cis-parinárico o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), se pone de manifiesto que la interacción de la SP-B con vesículas de DPPC/DPPG (7:1, mol/mol) no modifica los valores de anisotropía de fluorescencia de estas sondas tanto en el estado gel como en el líquido-cristalino. Dado que éstas se localizan en el interior hidrofóbico de la bicapa, estos resultados sugieren que la SP-B no modifica sustancialmente el empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos (Baatz et al., 1990). Cuando el mismo tipo de vesículas se marcan con 6-NBD-PC se observa que la interacción de la SP-B con estas vesículas incrementa considerablemente los valores de anisotropía de fluorescencia en el estado gel y ligeramente en el estado líquido-cristalino. El efecto de la SP-B depende de la concentración del péptido y alcanza un valor máximo en presencia de un 2% de SP-B (en peso). Cuando se utiliza la sonda 6-NBD-PG, la interacción con la proteína produce un incremento de la anisotropía de fluorescencia a bajas concentraciones del péptido (0.5%, en peso) y una disminución a concentraciones más altas, llegando a anularse completamente la transición de fase en presencia de un 2% de SP-B (Baatz et al., 1990). Estos resultados muestran una interacción preferente de la SP-B con vesículas que contienen fosfatidilglicerol, probablemente a través de interacciones electrostáticas entre grupos cargados positivamente de la SP-B y las cabezas polares del fosfatidilglicerol. El efecto que la SP-B ejerce sobre las cadenas de acilo resulta ser limitado (Morrow et al., 1993 a). En la figura 7 se muestra un esquema del modelo más aceptado para la estructura de la SP-B en bicapas lipídicas.
- La SP-B incrementa la velocidad de adsorción de fosfolípidos a la interfase aire-líquido (Hawgood et al., 1987; Revak et al., 1988; Waring et al., 1989; Sarin et al., 1990; Pérez-Gil et al., 1992 a).
- Cuando la SP-B se sitúa en la interfase aire-líquido incrementa la inserción de fosfolípidos, añadidos en la subfase, en la monocapa interfacial (Oosterlaken-Dijksterhuis et al., 1991 a). La inserción de fosfolípidos a la monocapa no depende de la clase de lípido empleada y se incrementa a medida que lo hace la concentración de fosfolípidos en la subfase o la concentración de proteína en la monocapa. La inserción depende del tamaño de vesícula: la tasa de inserción de vesículas unilamelares grandes de DPPC/PG de huevo (7:3, en peso) es 10 veces mayor que la de vesículas unilamelares pequeñas de la misma composi-

ción, probablemente debido al menor radio de curvatura de estas últimas. El proceso de inserción depende de la presencia de cationes divalentes, especialmente calcio (Oosterlaken-Dijkterhuis et al., 1991 a).



**FIGURA 7. Modelo estructural propuesto para la SP-B en bicapas lipídicas.**

#### *1.3.2.1.3. Funciones de la SP-B*

Se han propuesto varias posibles funciones de la SP-B en el surfactante pulmonar (Figura 10):

- Participación en la formación de la mielina tubular. " In vitro" se necesita la presencia de SP-B para reconstituir mielina tubular (Suzuki et al., 1989, Williams et al., 1991). No se conocen los mecanismos que intervienen en la formación de la mielina tubular, pero se supone que deben existir procesos de fusión de membrana. La SP-B induce mezcla del componente lipídico entre vesículas (Poulain et al., 1991; Oosterlaken-Dijkterhuis et al., 1992) y podría estar implicada en esos fenómenos de fusión.
- Contribuye a las propiedades tensoactivas del surfactante facilitando la adsorción de los fosfolípidos a la interfase aire-líquido (Hawgood et al., 1987; Revak et al., 1988), contribuyendo al enriquecimiento de la monocapa en DPPC

durante el proceso de compresión por eliminación de fosfolípidos ácidos e insaturados de la monocapa (Yu y Possmayer 1990), y alterando el comportamiento de la monocapa durante el proceso de compresión (Longo et al., 1993).

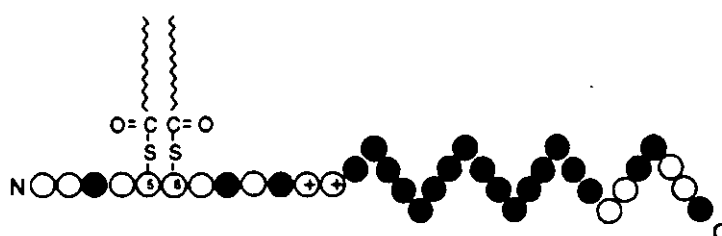
### 1.3.2.2. SP-C

#### 1.3.2.2.1. Estructura de la SP-C

Se conoce la secuencia de la proteína derivada del cDNA humano (Warr et al., 1987; Glasser et al., 1988 a y b), de rata (Fisher et al., 1989) y de ratón (Glasser et al., 1990 b). También se conoce la secuencia de la SP-C canina y bovina (Johansson et al., 1991 b; Stults et al., 1991), de conejo (Johansson et al., 1991 b) y de cerdo (Johansson et al., 1988). Todas ellas muestran una secuencia muy conservada. El precursor es una proteína de 197 aminoácidos, con una masa molecular de 20-21 kDa. En el extremo N-terminal aparece una secuencia relativamente hidrofílica, por lo que posiblemente el precursor de la SP-B carezca de péptido señal. El precursor de la SP-B puede ser una proteína integral de membrana en la que la secuencia madura del péptido serviría de señal, formando el dominio de interacción con la bicapa (Keller et al., 1991). No se han detectado sitios de glicosilación (Hawgood, 1989; Weaver y Whitsett, 1991).

La forma madura es un péptido de 35 aminoácidos, que se extiende entre los residuos 25 y 60 del precursor. Se han encontrado péptidos truncados, con uno o dos aminoácidos menos en la SP-C humana (Johansson et al., 1988), probablemente debido a una acción no específica de la proteasa que procesa sobre el precursor. Se pueden distinguir (Figura 8) dos zonas diferenciadas en la molécula de SP-C: Una región N-terminal, relativamente hidrofílica y una región C-terminal muy hidrofóbica. En la región N-terminal aparecen dos cisteínas en posiciones 5 y 6 que se unen mediante enlaces tioéster a dos cadenas de ácido palmítico (Curstedt et al., 1990; Stults et al., 1991). En la SP-C de perro sólo se une una molécula de ácido palmítico al único residuo de cisteína presente (Johansson et al., 1991 b; Stults et al. 1991). No se conoce la implicación funcional de esta modificación, pero probablemente la presencia de las cadenas hidrocarbonadas unidas a los residuos de cisteína modifica la interacción de la región N-terminal de la molécula, más hidrofílica, con los fosfolípidos, y estabilizaría una coformación determinada en esta zona. En esta misma región N-terminal aparecen dos residuos cargados, lisina y arginina, que

aparecen en las posiciones 11 y 12 del péptido maduro. A continuación, desde el residuo 13 al 33, se extiende una región muy hidrofóbica, que reúne los requisitos estructurales necesarios para considerarse como una  $\alpha$ -hélice transmembranal (Takahashi et al 1990; Waring et al 1990). Esta predicción se ha confirmado mediante espectroscopía de FTIR (Pastrana et al., 1991; Vandenbussche et al., 1992 b) donde se ha calculado que el eje de la hélice aparece paralelo a las cadenas de acilo de los fosfolípidos de la bicapa. Esta región incluye un 43% de valinas y un 35% de leucinas o isoleucinas.



**FIGURA 8:** Representación esquemática de la estructura de la SP-C.

Los círculos llenos indican aminoácidos hidrofóbicos. La zona ondulada corresponde la región extremadamente hidrofóbica de la proteína que se supone que atraviesa la bicapa formando una  $\alpha$ -hélice hidrofóbica (Figura 9). Las cisteínas de posiciones 5 y 6 están palmitoiladas. Tomado de Curstedt et al. (1990).

La SP-C presenta un alto contenido en  $\alpha$ -hélice. Se han calculado porcentajes de un 60 % de esta estructura para la SP-C en lípidos (Pastrana et al., 1991; Keough et al., 1992). Estos valores están de acuerdo con los obtenidos por Pérez-Gil y colaboradores (1993) asignaron un 51% de  $\alpha$ -hélice para la SP-C en una mezcla de acetonitrilo/agua (80:20, v/v). La reconstitución de la proteína en lípidos incrementaba el porcentaje de  $\alpha$ -hélice de la SP-C hasta un 60% en presencia de micelas de LPC, y hasta un 70% en presencia de vesículas de DPPC. Otros investigadores, mediante espectroscopía infrarroja, atribuyen un contenido helicoidal más alto (hasta un 90%) para la SP-C en presencia de lípidos (Vandenbussche et al., 1992 b).

El espectro de dicroísmo circular de la SP-C en mezclas de trifluoretanol/agua (70:30, v/v) muestran un alto contenido (80%) de estructura  $\beta$  (Pérez-Gil et al., 1993). Los

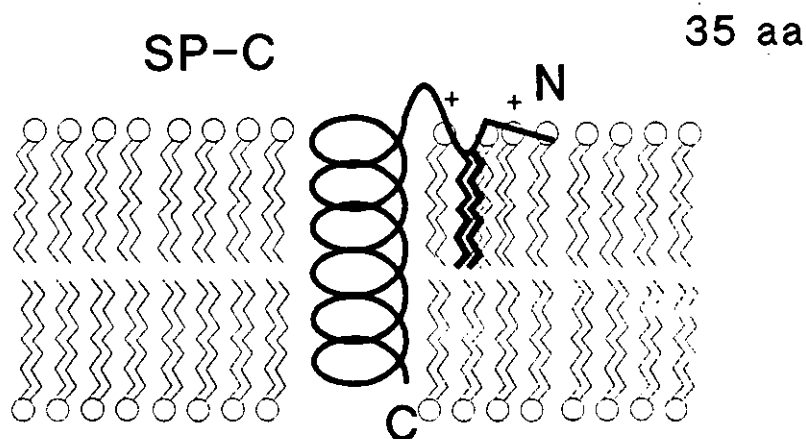
estudios estructurales de SP-C por medio de espectroscopía infrarroja (Vandenbussche et al., 1992 b) indican que la proteína posee una fracción apreciable de estructura  $\beta$ , que desaparece prácticamente cuando la proteína se reconstituye en lípidos. El hecho de que la SP-C adopte una estructura secundaria dependiente del medio en que se encuentre puede estar relacionado con la acilación de la proteína. Algunos experimentos (Kato et al., 1991) realizados con péptidos hidrofóbicos alquilados con una cadena hidrofóbica larga en diferentes posiciones, y muestran que los péptidos adoptan diferentes estructuras, dependiendo del medio en que se encuentran. Cuando el péptido está alquilado en una posición central, éste adopta una conformación en  $\alpha$ -hélice en lípidos y una estructura de tipo  $\beta$  en disolventes orgánicos. Baatz y colaboradores (1992) han descrito la existencia de un dímero de SP-C bovina. No presenta acilación en los residuos de cisteína. Mediante espectroscopía infrarroja estos autores muestran que a diferencia de la SP-C monomérica, que se estructura como  $\alpha$ -hélice en presencia de fosfolípidos, la forma dimérica adopta mayoritariamente la estructura de cadena  $\beta$ . No se conoce el tipo de fuerza que estabiliza la interacción, aunque podría estabilizarse a partir de la formación de puentes disulfuro entre los residuos de cisteína de dos cadenas distintas. La dimerización provoca un cambio en la estructura secundaria de la proteína que podría afectar al tipo de interacción que se establece con los fosfolípidos.

#### *1.3.2.2.2. Propiedades de la SP-C. Unión a lípidos*

La SP-C es una proteína aún más hidrofóbica que la SP-B. Es soluble únicamente en disolventes orgánicos. Al igual que la SP-B se aísla junto con los lípidos del surfactante en la fase orgánica resultante de la extracción lipídica del complejo lipoproteico. Los datos de los que se dispone acerca de la interacción de la SP-C con los fosfolípidos son los siguientes:

- La SP-C aumenta la adsorción de fosfolípidos a la interfase aire-líquido (Warr et al., 1987; Revak et al., 1988; Pérez-Gil et al., 1992 a).
- La SP-C forma monocapas muy estables (presión de superficie de colapso de 37 mN/m) y cataliza la inserción de fosfolípidos a la interfase aire-líquido desde la subfase, aunque con menor eficacia que la SP-B (Oosterlaken-Dijsterhuis et al., 1991 a).

- La SP-C no parece inducir mezcla del componente lipídico entre vesículas medida como transferencia de energía entre sondas de NBD-PE y RH-PE situadas en distintas vesículas (Poulain et al., 1991) o como la variación de la tasa de emisión de fluorescencia dímero/monómero de pireno-PC (Oosterlaken-Dijksterhuis et al., 1992).
- El modelo de interacción con los lípidos propuesto para la SP-C se basa en la existencia de un dominio hidrofóbico que penetra en el interior de la bicapa, probablemente a través de una  $\alpha$ -hélice transmembranal y de la asociación del dominio N-terminal mediante interacciones electrostáticas con las cabezas polares de los fosfolípidos (Figura 9). Simatos y colaboradores (1990), mediante calorimetría diferencial de barrido, observaron que la SP-C disminuye la temperatura de transición de fase ( $T_m$ ) y la entalpía de la transición de vesículas neutras de DPPC. Utilizando otras técnicas, como resonancia magnética nuclear, se puso de manifiesto que la SP-C disminuye el orden de las cadenas de acilo de vesículas de DMPC- $d_{54}$  (Simatos et al., 1990). Los resultados obtenidos muestran que la SP-C penetra en el interior de la bicapa modificando el empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas. Mediante la utilización de sondas fluorescentes (NBD-PC y NBD-PG), que se localizan preferentemente en la región superficial de la membrana, Horowitz y colaboradores (1992) observaron que la presencia de SP-C incrementaba los valores de anisotropía de fluorescencia de vesículas de DPPC/DPPG (7:1, mol/mol). Estos resultados muestran que la SP-C ordena la región de la cabeza polar de la bicapa. Recientemente, Shiffer y colaboradores (1993) han observado mediante calorimetría diferencial de barrido que la SP-C incrementa la temperatura de transición de fase ( $T_m$ ) y disminuye la entalpía de la transición de fase de vesículas multilamelares de DPPC y DPPG. El incremento de  $T_m$  es mucho más acusado con las vesículas ácidas. Estos resultados indican que la SP-C penetra en el interior de la bicapa, perturbando el empaquetamiento de las cadenas de acilo, y por otra parte, interacciona con las cabezas polares de los fosfolípidos por interacciones electrostáticas. Mediante la utilización de microscopía de epifluorescencia, Pérez-Gil y colaboradores (1992 b) han observado que la SP-C altera el empaquetamiento de monocapas de DPPC, favoreciendo la formación de dominios sólidos más numerosos y más pequeños que los que se observan en ausencia de SP-C, de los que se excluye una sonda fluorescente, NBD-PC, que se distribuye principalmente en la fase fluida.



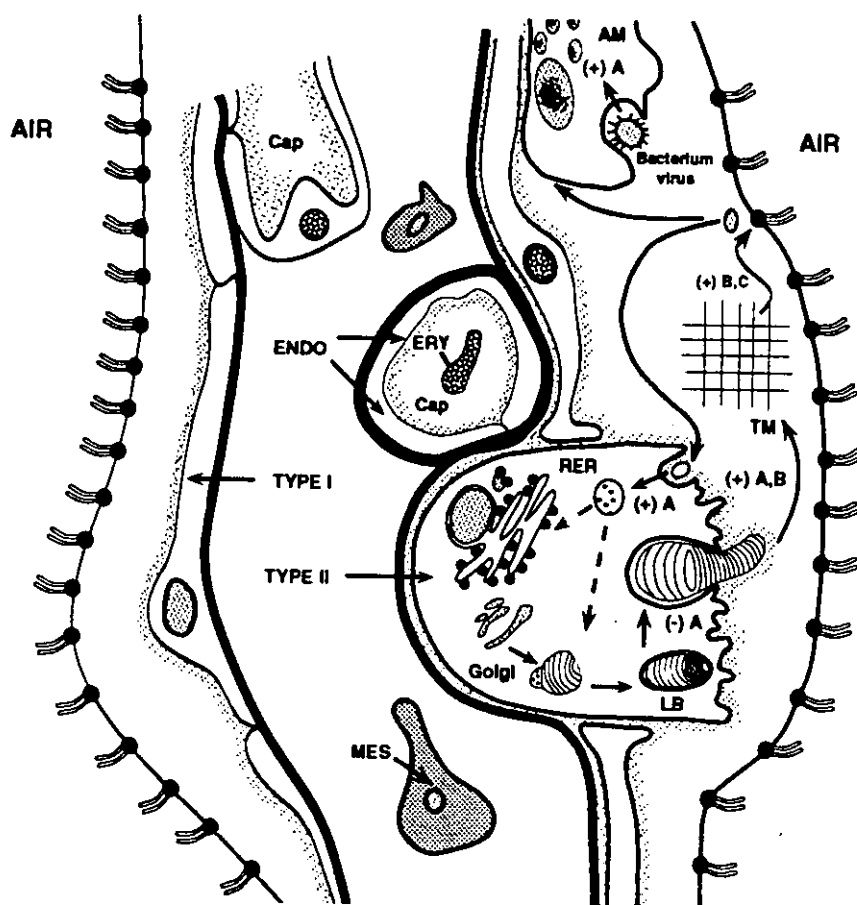
**FIGURA 9:** Modelo estructural propuesto para la SP-C en bicapas lipídicas.

#### *1.3.2.2.3. Funciones de la SP-C*

La SP-C desempeña distintas funciones en el surfactante pulmonar (Figura 10).

- Incrementa la velocidad de adsorción de los fosfolípidos a la interfase aire-líquido (Warr et al., 1987; Revak et al 1988;).
- Aumenta la estabilidad de la monocapa a los máximos valores de compresión (Pastrana et al., 1991).





**FIGURA 10. Participación de las proteínas en el ciclo metabólico del surfactante pulmonar.**

Los lípidos y las proteínas se sintetizan en el retículo endoplasmático de los neumocitos tipo II y se transportan, vía aparato de Golgi, a los cuerpos lamelares, vesículas de almacenamiento intracelular del surfactante. Después de la secreción al espacio extracelular, el contenido de los cuerpos lamelares se transforma en **mielina tubular**, precursora de una monocapa en la interfase aire-líquido. El surfactante se recicla mediante la captura del mismo por los neumocitos tipo II, donde puede ser degradado o reciclado al incorporarse de nuevo en los cuerpos lamelares para ser resecretado. Las proteínas SP-A y SP-B son necesarias para la formación de la mielina tubular. Las proteínas hidrofóbicas intervienen de manera decisiva en la transferencia de fosfolípidos desde la mielina tubular a la interfase aire-líquido. La SP-A parece actuar como reguladora de la concentración de surfactante en el alveolo, inhibiendo su secreción y activando su recaptura por los neumocitos tipo II. La SP-A parece asimismo implicada en la activación de la fagocitosis de bacterias y virus por los neumocitos tipo II. Tipo I, neumocito tipo I; Tipo II, neumocito tipo II; ENDO, células endoteliales; MES, célula mesenquimática; ERY, eritrocito; CAP, capilar; AM, macrófagos alveolares; RER, retículo endoplasmático rugoso; LB, cuerpos lamelares; TM, mielina tubular; A, B y C, SP-A, SP-B y SP-C, respectivamente. (-) A, inhibido por la SP-A; (+) A,B, requiere SP-A y SP-B; (+) B,C, estimulado por SP-A y SP-C. Tomado de Van Golde et al. (1994).

#### 1.4. SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DEL SURFACTANTE PULMONAR

El surfactante pulmonar es esencial para el correcto funcionamiento del ciclo respiratorio. Su ausencia en niños nacidos prematuramente conduce al desarrollo del Síndrome de Distrés Respiratorio del Neonato (Avery y Mead, 1959; Fujiwara et al., 1980), que se caracteriza clínicamente por baja compliance pulmonar asociada con colapso alveolar. La instilación intratraqueal de muestras de surfactante preparadas a partir de extractos orgánicos de pulmones animales adultos mejora considerablemente la tasa de mortalidad y las complicaciones clínicas de los pacientes (Hoekstra et al., 1991; Liechty et al., 1991).

Desde un punto de vista fisiológico, se atribuyen al surfactante tres funciones principales:

- Estabiliza los alveolos al final de la espiración evitando el colapso de los más pequeños (Factor antiatelectásico).
- Interviene en la regulación de la homeostasis del líquido alveolar (Factor antiedematoso).
- Participa en la defensa alveolar.

##### 1.4.1. FACTOR ANTIALECTASICO

La mecánica respiratoria se produce mediante la expansión y contracción cíclicas de los alveolos pulmonares. El parénquima pulmonar está constituido por alveolos de distintos tamaños. Estas cámaras alveolares funcionan independientemente unas de otras. Los alveolos están recubiertos por el surfactante pulmonar, que se dispone formando una monocapa estable de DPPC, y tiene la función de disminuir la tensión superficial del líquido al disminuir el área del alveolo durante la espiración. Si este complejo lipoproteico no estuviera presente, se generarían considerables diferencias de presión entre alveolos de distinto tamaño que conducirían al colapso de los más pequeños. Sin embargo, en presencia de surfactante, al disminuir el área del alveolo al final de la espiración, la reducción del área provoca el incremento de la concentración de este agente tensoactivo, que reduce la tensión superficial y evita el colapso alveolar.

Aunque no ha podido establecerse mediante análisis bioquímicos la composición de la monocapa responsable de reducir la tensión superficial, estudios biofísicos apoyan la

posibilidad de que esté altamente enriquecida en DPPC. Todos los fosfolípidos son capaces de formar una monocapa estable en la interfase aire-agua, de acuerdo con su naturaleza de lípidos anfipáticos, insolubles en agua. Los fosfolípidos se disponen con la cabeza polar en contacto con el agua y las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos extendiéndose hacia el aire. Al excluir las moléculas de agua de la superficie disminuyen la tensión superficial desde 70 hasta 25 dinas/cm, que constituye la tensión superficial de equilibrio de la mayor parte de los fosfolípidos. Si los fosfolípidos se comprimen a una superficie inferior a la que ocuparían bajo condiciones de equilibrio, se excluyen más moléculas de agua de la superficie y la tensión superficial puede reducirse a valores próximos a 0 dinas/cm. Una monocapa en estas condiciones no es estable y colapsa. El material tiene tendencia a escapar de la superficie y la tensión superficial se eleva a valores próximos a los de equilibrio.

Para ejercer su función el surfactante debe ser capaz de:

- reducir la tensión superficial a valores próximos a cero a bajos volúmenes alveolares.
- la monocapa formada no debe colapsar, sino mantenerse estable en estas condiciones.
- debe adsorberse rápidamente desde la hipofase.

#### **1.4.1.1. El surfactante como agente reductor de la tensión superficial**

Existen muchos argumentos que apoyan la posibilidad de que la DPPC sea el fosfolípido responsable de la reducción de la tensión superficial:

- Este fosfolípido es el único que se encuentra en el surfactante en cantidades suficientes para recubrir la interfase aire-agua.
- Medidas realizadas con balanzas de tensión superficial muestran que monocapas de DPPC pueden alcanzar valores de tensión superficial próximas a cero (Fleming et al., 1983; Fagan y Keough, 1988).
- Para que una monocapa de fosfolípidos presente la capacidad de disminuir la tensión superficial a valores suficientemente bajos cuando se comprime, debe encontrarse en estado cristalino. A la temperatura fisiológica de 37°C, la DPPC,

que presenta una temperatura de transición de fase de 41°C, se encuentra en estado cristalino. Por encima de la temperatura de transición de fase, la monocapa colapsa antes de alcanzar la reducción de la tensión superficial necesaria para asegurar la estabilidad alveolar.

- Monocapas de DPPE ( $T_m = 64^\circ\text{C}$ ) colapsan al llegar a valores de tensión superficial próximos a los de equilibrio. Cuando se incrementa la metilación del grupo amino de la PE se produce una disminución del valor de tensión superficial que se alcanza antes del colapso (Keough et al., 1988). Posiblemente el estado metaestable necesario para alcanzar valores de tensión superficial muy bajas requiere una especial conformación de la cabeza polar o un grado de hidratación que no posee la PE.

#### 1.4.5.1.2. Estabilidad de la monocapa

No todas las regiones del pulmón se contraen y expanden al unísono en cada ciclo respiratorio. Algunos alveolos permanecen a bajos volúmenes durante periodos de tiempo más o menos largos. Esto supone que la monocapa que recubre la interfase aire-líquido ha de mantenerse comprimida durante esos periodos de tiempo. Medidas directas en el pulmón "in situ" confirman que se alcanzan valores de tensión superficial muy bajos a volúmenes pulmonares residuales (Schürch et al., 1976; 1978; 1982). Estos valores de tensión superficial son además muy estables, de manera que el retorno a los valores de equilibrio se produce muy lentamente. Igualmente "in vitro" con muestras preparadas a partir de extractos lipídicos del surfactante, se han conseguido valores de tensión superficial próximos a cero que se mantienen durante periodos de tiempo largos (Schürch et al., 1989; 1992). Sin embargo, las monocapas son inestables en ese estado de compresión, y colapsan, por lo que la tensión superficial se incrementa hasta alcanzar la de equilibrio. La tasa de relajación, medida como incremento de la tensión superficial que se produce manteniendo constante el área ocupada por los fosfolípidos en la monocapa, depende del tipo de fosfolípido. Sólo se han conseguido tasas de relajación bajas con monocapas de PC por debajo de la temperatura de transición de fase. A temperaturas superiores a la temperatura de transición de fase aumenta de manera drástica la tasa de relajación (Goerke y Gonzales, 1981). Por tanto, la presencia de una monocapa enriquecida en DPPC en estado de gel es una condición imprescindible para asegurar la estabilidad alveolar. La presencia de las proteínas

hidrofóbicas, especialmente la SP-C, mejora la estabilidad de ésta a las máximas relaciones de compresión (Pastrana et al., 1991).

#### 1.4.1.3. Adsorción de los fosfolípidos a la interfase

Los fosfolípidos que se inyectan a una subfase acuosa a una temperatura por debajo de la de transición de fase se adsorben muy lentamente a la interfase aire-líquido (Villalonga, 1968; Phillips y Hauser, 1974). Por tanto, una de las funciones que se atribuyen al resto de componentes lipídicos del surfactante, sería la de facilitar el transporte de DPPC desde la subfase a la interfase aire-líquido, permitiendo por tanto una rápida adsorción. Así, mediante calorimetría diferencial de barrido (Mc Murchie et al., 1983; Keough et al., 1985) y mediante FTIR (Reilly et al., 1989), se ha observado que el surfactante de muchas especies estudiadas se encuentra en estado líquido-cristalino a 37 °C.

Mediante estudios con balanzas de tensión superficial se ha comprobado que la adición de fosfolípidos insaturados a vesículas de DPPC mejora la adsorción a la interfase (Notter, 1988). Asimismo, una mezcla de PC insaturadas, colesterol y POPG en cantidades parecidas a las que se encuentran en el surfactante pulmonar aumenta sustancialmente la velocidad de adsorción frente a vesículas de DPPC (Fleming y Keough, 1988).

Desde el aislamiento y caracterización de las proteínas específicas del surfactante la investigación se ha centrado en la influencia de las mismas en el proceso de adsorción. Las proteínas específicas del surfactante aumentan la adsorción de los fosfolípidos. Tanto la SP-B (Takahashi y Fujiwara, 1986; Curstedt et al., 1987; Hawgood et al 1987; Revak et al., 1988) como la SP-C (Curstedt et al., 1987; Warr et al., 1987; Revak et al 1988) o mezclas de ambas (Yu y Possmayer 1988, Hall et al., 1992; Pérez-Gil et al., 1992 a) aumentan extraordinariamente la formación de una monocapa en la interfase. La adsorción es más rápida en presencia de fosfolípidos aniónicos (Tanaka et al 1986; Pérez-Gil et al., 1992 a). Esta actividad se estimula en presencia de SP-A (Hawgood et al., 1985; Chung et al., 1989; Venkitaramen et al., 1990), aunque se requiere la presencia de las proteínas hidrofóbicas, por otra parte, sólo mejora ligeramente la adsorción en ausencia de proteínas hidrofóbicas (Hawgood et al., 1987; Yu y Possmayer, 1990). La máxima adsorción ocurre, por tanto, en presencia de SP-A, SP-B, SP-C y calcio (Chung et al., 1989).

Cuando se ensayan preparaciones de fosfolípidos que contienen SP-B o SP-C, algunos autores observan que la primera es más efectiva estimulando la adsorción. Asimismo, los valores de tensión superficial que se alcanzan son menores (Curstedt et al., 1987; Yu y Possmayer, 1988; Mathialagan y Possmayer, 1990;). Sin embargo, en otros trabajos no se han encontrado diferencias entre ambas proteínas hidrofóbicas (Venkitaraman et al., 1990). Yu y Possmayer (1990) observaron que en presencia de SP-C se alcanzaban más rápidamente los valores de tensión superficial de equilibrio de mezclas de DPPC y PG (9:1 o 7:3, en masa) que en presencia de cantidades equivalentes de SP-B. Tras sucesivos ciclos de contracción y expansión en presencia de SP-B, pero no de SP-C, las muestras alcanzaban valores de tensión superficial próximos a cero, lo que indicaría que la SP-B podría contribuir al enriquecimiento de la monocapa en DPPC mediante exclusión de otros componentes, en este caso PG. La incubación con anticuerpos frente a la SP-B reduce drásticamente la velocidad de adsorción de surfactantes artificiales utilizados como terapia en el tratamiento del Síndrome de Distrés Respiratorio del Neonato (Kobayashi et al., 1992), lo que confirma la importancia de esta proteína para una eficaz adsorción de los fosfolípidos a la interfase.

#### **1.4.2. PARTICIPACION DEL SURFACTANTE EN LA HOMEOSTASIS DEL LIQUIDO ALVEOLAR**

El surfactante pulmonar actúa como un agente antiedematoso. El movimiento de fluido a través del epitelio alveolar depende del balance de fuerzas que tienden a causar movimiento de líquido fuera de los capilares y las fuerzas que tienden a causar absorción del mismo hacia los capilares. Las primeras son la presión capilar (7 mm Hg), la presión coloidsmótica del líquido intersticial (14 mm Hg) y una presión hidrostática negativa en el líquido intersticial que, al menos en parte, depende de la tensión superficial en la interfase aire-líquido (Nieman et al., 1988). Las fuerzas que tienden al movimiento de líquido hacia los capilares es la presión coloidsmótica del plasma (28 mm Hg). El balance neto conduce a una presión de filtración de 1 mm Hg, que produce un flujo continuo desde los capilares hacia el espacio intersticial. Este líquido es enviado de nuevo hacia la circulación mediante el sistema linfático pulmonar. Cualquier factor que produzca elevación de la presión del líquido intersticial provocará el llenado de los espacios intersticiales (edema intersticial) y, en casos más graves, de los alveolos (edema alveolar), comprometiendo de manera muy severa la función respiratoria.

El surfactante pulmonar disminuye la presión intersticial negativa, lo que reduce la tendencia del líquido a escapar de los capilares. En un alveolo hipotéticamente esférico, la tensión superficial en la interfase aire-líquido crea una tendencia de la propia capa acuosa a separarse de la estructura del alveolo, generando de esta forma una presión hidrostática negativa adyacente a la pared alveolar. Los alveolos poseen más bien una geometría poliédrica (Wilson y Bachofen, 1982; Weibel y Bachofen, 1987). Aunque las paredes lisas del poliedro no generan una presión hidrostática a causa de la ausencia de curvatura, los ángulos agudos con un pequeño radio de curvatura presentan una elevada tensión superficial que contribuye a generar una presión hidrostática negativa en el intersticio pulmonar. Se ha demostrado que cada valor de curvatura de la superficie alveolar posee un nivel crítico de tensión superficial, por encima del cual se produce la inundación del alveolo (Guyton et al., 1984).

La importancia del surfactante para el mantenimiento de la homeostasis del líquido alveolar se pone de manifiesto por el hecho de que recién nacidos con deficiencias de surfactante presentan también gran parte de los pulmones encharcados, y porque el lavado de los pulmones con un detergente que elimina el surfactante pulmonar conduce al desarrollo de un edema alveolar (Nieman et al., 1988).

### **1.4.3. PARTICIPACION EN LA DEFENSA ALVEOLAR**

#### **1.4.3.1. Interacción con los macrófagos alveolares**

El pulmón se encuentra continuamente expuesto a la atmósfera. Puede sufrir daños provocados por agentes infecciosos y tóxicos. Los macrófagos alveolares ejercen la principal actividad de defensa mediante la fagocitosis y eliminación de partículas extrañas y microorganismos. Existen evidencias experimentales de que el surfactante pulmonar estimula la fagocitosis y degradación de bacterias por los macrófagos alveolares (La Force et al., 1973; Juers et al., 1976; O'Neill et al., 1984). En los últimos años se ha atribuido a las proteínas hidrosolubles del surfactante una gran importancia en la defensa alveolar.

La SP-A y la SP-D son estructuralmente muy semejantes a otras proteínas como la conglutinina bovina y las proteínas del suero que unen manosa. Todas ellas intervienen en

el reconocimiento de carbohidratos de las paredes celulares de patógenos o de células infectadas por ellos (Sastry y Ezekowitz, 1993).

### SP-A

La SP-A se une a los macrófagos alveolares (Wintergerst et al., 1989; Wright et al., 1989). El mecanismo de interacción no se conoce, pero podría implicar la existencia de un receptor (Wintergerst et al., 1989; Pison et al., 1992). La unión de  $^{125}\text{I}$ -SP-A a los macrófagos se inhibe en presencia de SP-A no marcada y por las proteínas C1q y colágeno tipo V (Pison et al., 1992), por lo que parece probable que la región tipo colágeno de la SP-A esté implicada en el reconocimiento de esta proteína por los macrófagos alveolares. Como consecuencia de esta interacción se producen los siguientes fenómenos:

- Estimulación de la migración y activación de los macrófagos. La SP-A estimula la quimiotaxis de los macrófagos alveolares (Wright y Youmans, 1993). Esta estimulación depende de la presencia del dominio tipo colágeno de la SP-A. Además, en presencia de la proteína, se incrementa la producción de radicales superóxido por estas células. La activación es específica de los macrófagos alveolares y no se produce en macrófagos peritoneales u otras células fagocíticas como leucocitos polimorfonucleares o monocitos (Van Iwaarden et al., 1990; 1992 c). La desglicosilación de la proteína no inhibe la activación de los macrófagos inducida por la SP-A (Van Iwaarden et al., 1992 c), lo que indica que los azúcares unidos a la SP-A no están implicados en la unión de la SP-A a los macrófagos que conduce a la activación de éstos.
- Estimulación de la fagocitosis de bacterias por macrófagos. "In vitro", la SP-A incrementa la fagocitosis de *Staphylococcus aureus*, previamente opsonizadas por suero, por los macrófagos alveolares (Van Iwaarden et al., 1990). La actividad de la SP-A parece ejercerse a través de la interacción con los macrófagos alveolares, ya que la preincubación de estas células con la proteína incrementa un 70% el número de bacterias fagocitadas por los macrófagos. Sin embargo, no existen diferencias significativas cuando muestras de *S. aureus* se preincuban con SP-A con respecto a los controles no preincubados con SP-A (Van Iwaarden et al., 1990). Tenner y colaboradores (1989) probaron que la SP-A aumentaba la fagocitosis de eritrocitos de oveja por monocitos periféricos y macrófagos. Los eritrocitos habían sido previamente opsonizados con anticuerpos anti-



- eritrocito y factores de complemento. La misma actividad la ejerce la proteína del complemento C1q, de manera que ambas proteínas se unen a un mismo receptor, probablemente el receptor de colectinas (Malhotra et al., 1990). De acuerdo con estos resultados, en principio no parece probable una participación de la SP-A en la defensa actuando como puente entre las células microbianas y los macrófagos. No sería una "opsonina" en sentido estricto. Sin embargo, otros resultados experimentales sí atribuyen a la SP-A una función de opsonización. Manz-Keinke y colaboradores (1992) han comprobado que la SP-A aumenta la fagocitosis de *E. coli*, *S. aureus* y *Ps. aeruginosa*, no opsonizadas previamente con suero, por los macrófagos alveolares. Asimismo, Mc Neely y Coonrod (1993) demostraron que la SP-A se une tanto a la superficie de *S. aureus* como a la de los macrófagos alveolares. Sin embargo, al igual que en los experimentos de Van Iwaarden y colaboradores (1990), en ausencia de suero no se produce internación de las bacterias por los macrófagos.
- Opsonización y estimulación de la fagocitosis de virus por macrófagos. La SP-A se une al virus del herpes simplex (HSV-1) y favorece su fagocitosis por los macrófagos alveolares (Van Iwaarden et al., 1992 b). Asimismo, la SP-A se une a células infectadas por el virus, que muestran en su membrana plasmática proteínas específicas del HSV-1. El proceso implica la interacción de las cadenas de azúcares de la SP-A con una proteína de tipo lectina presente en la membrana de la partícula viral. La SP-A interaccionaría, por otra parte, con el receptor de los macrófagos alveolares, actuando así como puente entre la partícula viral y los macrófagos alveolares, facilitando el proceso de fagocitosis (Van Iwaarden et al., 1991; 1992 c).

## SP-D

La SP-D se une a la superficie de los macrófagos alveolares estimulando la producción de radicales superóxido por estas células. Al igual que la SP-A, la activación inducida por la SP-D es específica para los macrófagos alveolares. No se ha comprobado si la SP-A y la SP-D se unen a un mismo receptor presente en los macrófagos alveolares, pero no en otras células fagocíticas, o si la especificidad observada se debe a otras causas. Sin embargo, en contraste con la SP-A, la activación de los macrófagos alveolares inducida por la SP-D, no se inhibe en presencia de fosfolípidos (Van Iwaarden et al., 1992 a).

Kuan y colaboradores (1992) han indicado que la SP-D interviene en la aglutinación de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi* y *Klebsiella pneumoniae*. Sin embargo, no se une a *Staphylococcus aureus*, la única bacteria Gram positiva ensayada. La unión de la SP-D a las bacterias Gram negativas puede inhibirse por el lipopolisacárido de la pared bacteriana, EDTA, monosacáridos como maltosa y glucosa, pero no por N-acetilglucosamina (Kuan et al., 1992; Crouch et al., 1992). Por tanto, la unión de la SP-D a las bacterias se produce a través de la interacción de azúcares del lipopolisacárido de la pared celular de estas bacterias al dominio de unión de carbohidratos de la SP-D (Crouch et al., 1992).

#### 1.4.3.2. El surfactante pulmonar como agente inmunosupresor

El surfactante pulmonar suprime la respuesta de linfocitos periféricos frente a mitógenos y antígenos en distintas especies estudiadas (Ansfield et al 1979; Wilsher et al., 1988). Estos efectos dependen de la dosis de surfactante empleada. Se ha observado también la reducción de la producción de anticuerpos por los linfocitos B y de la diferenciación de linfocitos citotóxicos en presencia de surfactante (Sitrin et al., 1985; Wilsher et al., 1988). Richman y colaboradores (1990) muestran el desarrollo de una respuesta inmune de tipo celular en cobayas inmunizados con una cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis*. En aquellos cerdos a los que se les realiza un lavado broncoalveolar con suero salino para eliminar el surfactante pulmonar previamente a la introducción del antígeno, la respuesta es marcadamente mayor que en cerdos control a los que el lavado se realiza con surfactante pulmonar bovino. En estos últimos, el nivel de respuesta es semejante al de los controles no tratados con el antígeno. Estos experimentos muestran un efecto inmunosupresor del surfactante en el desarrollo de una neumonitis inducida en un modelo animal. Se trataría de un mecanismo de defensa para proteger al alveolo de una respuesta inmune amplificada. Estos resultados explican por qué en el alveolo no existe una respuesta inmune específica a pesar de la constante presencia de antígenos inhalados al respirar.

Ansfield y Benson (1980) identificaron al componente lipídico del surfactante como el responsable de la inhibición. Los componentes mayoritarios del complejo, como fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol o fosfatidilinositol, suprimen la respuesta inmune de linfocitos, mientras que la fosfatidiletanolamina, la esfingomielina o el colesterol la aumentan (Wilsher et al., 1988). El papel del surfactante pulmonar en la regulación de la respuesta inmune puede estar determinado por las proporciones relativas de componentes supresores

y estimuladores. Esta proporción puede alterarse en distintos estados patológicos (Wilsher et al., 1990).

El mecanismo de inmunosupresión no se conoce muy bien, pero parece ser que se produce directamente sobre los linfocitos y no a través de las células accesorias. La incubación de linfocitos en presencia de surfactante disminuye la proliferación de estas células estimulada por mitógenos. La preincubación de los monocitos, que actúan como células accesorias, con surfactante no afecta la proliferación de los linfocitos en las mismas condiciones (Wilsher et al., 1990).

## **1.5. CICLO METABOLICO DEL SURFACTANTE PULMONAR**

El surfactante pulmonar es un complejo dinámico cuya homeostasis depende de una serie de procesos:

- Síntesis de los componentes lipídico y proteico.
- Transporte de los lípidos y las proteínas hasta los cuerpos lamelares.
- Secreción de los cuerpos lamelares a la luz alveolar por exocitosis.
- Procesamiento extracelular para formar la mielina tubular y la monocapa responsable de las propiedades tensoactivas del complejo.
- Recaptura del surfactante por los macrófagos alveolares y, principalmente, por los neumocitos tipo II donde va a ser degradado vía lisosomal o reincorporado sin degradación en los cuerpos lamelares.

### **1.5.1. BIOSINTESIS DEL SURFACTANTE PULMONAR**

Los neumocitos tipo II son las células implicadas en la biosíntesis del surfactante pulmonar. Los fosfolípidos del complejo se sintetizan exclusivamente en estas células. Existen resultados experimentales que permiten suponer que algunas proteínas del surfactante se sintetizan no sólo en los neumocitos tipo II, sino también en las células epiteliales bronquiales denominadas células de Clara.

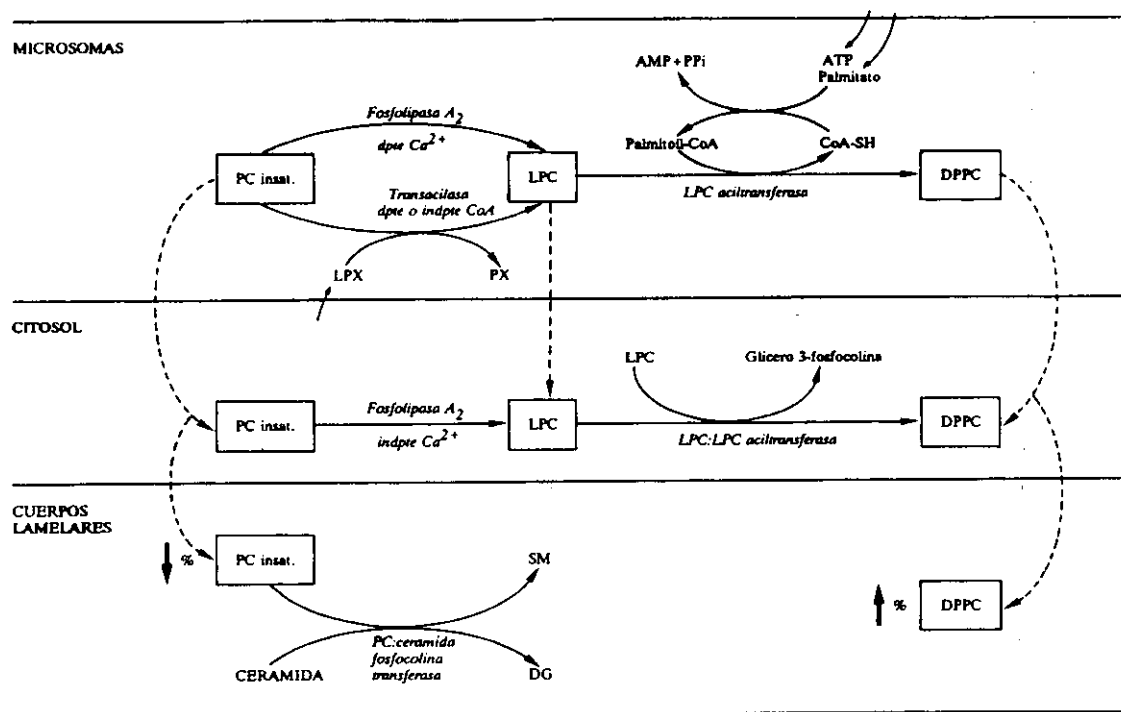
### 1.5.1.1. Biosíntesis de lípidos

Los fosfolípidos del surfactante se sintetizan exclusivamente en los neumocitos tipo II. La composición de las clases de fosfolípidos y de especies moleculares de fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol de los cuerpos lamelares de los neumocitos tipo II es similar a la del surfactante extracelular, aislado a partir de lavados broncoalveolares (Schlame et al., 1988; Casals et al., 1989; 1990).

La biosíntesis de los lípidos del surfactante pulmonar ha sido objeto de exhaustivas investigaciones y coincide, en líneas generales, con la síntesis de lípidos en otros órganos, salvo en lo que se refiere a la síntesis de DPPC, que es un fosfolípido característico del pulmón. Ha sido objeto de numerosas revisiones (Haagsman y Van Golde, 1991; Van Golde y Casals, 1991). Por tanto, esta revisión se va a limitar a describir los mecanismos implicados en la biosíntesis de DPPC, el fosfolípido responsable de disminuir la tensión superficial a valores próximos a cero a bajos volúmenes pulmonares. Al igual que en la mayoría de las células, los neumocitos tipo II sintetizan fosfatidilcolina por la vía "de novo", incorporando un ácido graso saturado en la posición sn-1 del glicerol y un ácido graso insaturado en la posición sn-2. Aunque en estas células se ha estimado que un 45% de la DPPC del surfactante se sintetiza "de novo" (Den Breejen et al., 1989), deben existir mecanismos que remodelen las PCs insaturadas. La información de la que se dispone hasta el momento permite establecer la existencia de distintos mecanismos de remodelación localizados en tres fracciones subcelulares (Figura 11):

- **Microsomas:** La remodelación de PCs insaturadas se realiza mediante un mecanismo de desacilación-reacilación en el que pueden estar implicadas las actividades enzimáticas que aparecen en la figura. La desacilación se realiza mediante una actividad fosfolipasa A2 dependiente de calcio. La reacilación de la LPC resultante se lleva a cabo por el concurso de la actividad palmitoil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa. Los neumocitos están enriquecidos en la actividad acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa si se compara con el tejido pulmonar (Crecelius y Longmore, 1984; Gilfillan et al., 1986). Además, esta enzima utiliza selectivamente palmitoil-CoA como sustrato frente a otros acil-CoAs en los neumocitos tipo II. El proceso de desacilación-reacilación puede llevarse a cabo también mediante una actividad transacilasa, dependiente o independiente de CoA. La actividad transacilasa mejor estudiada es la

dependiente de CoA e independiente de ATP (Nijssen y Van den Bosch, 1986 a, b). Además, existe otra actividad transacilasa en microsomas, que es independiente de CoA y ATP (Stanford y Frosolono, 1981).



**FIGURA 11: Mecanismos de remodelación implicados en el mantenimiento de los altos niveles de DPPC en el surfactante pulmonar.**

- **Citosol:** La formación de DPPC parece ser que se lleva a cabo mediante la transacilación entre dos moléculas de 1 palmitoil-sn-glicerol 3-fosfocolina, reacción catalizada por la enzima lisofosfatidilcolina:lisofosfatidilcolina aciltransferasa (Brumley y Van den Bosch, 1977; Casals et al., 1982). La contribución relativa de este mecanismo de transacilación frente al de reacilación en la síntesis de DPPC ha sido un tema de discusión, pero en la actualidad existen evidencias experimentales que indican que el mecanismo de transacilación citosólico contribuye en mucha menor proporción a la síntesis de

que el mecanismo de reacidación (Crecelius y Longmore, 1984; de Vries et al., 1985 a).

Cuerpos lamelares: Lecerf y colaboradores (1987) han descrito la existencia de una actividad enzimática que transfiere fosfocolina de PC insaturadas a ceramidas. Esta fosfatidilcolina:ceramida fosfocolina transferasa parece utilizar preferentemente como sustrato 16:0/18:1-PC, y se ha propuesto que puede tener una implicación en la eliminación de especies insaturadas de PCs en favor del aumento de la proporción de especies dipalmitoil-PC. De esta manera contribuye de forma indirecta al aumento de la proporción de DPPC en los cuerpos lamelares, orgánulos de almacenamiento intracelular del surfactante pulmonar.

#### 1.5.1.2. Biosíntesis y procesamiento de las proteínas

##### SP-A

La expresión de la SP-A es específica del pulmón. Mediante hibridación "in situ" se ha demostrado la presencia de mRNA de SP-A en los neumocitos tipo II (Phelps y Floros, 1988; Auten et al., 1990; Sugahara et al., 1992). Se ha observado que esta proteína se expresa también en las células epiteliales bronquiales de Clara en algunas especies como rata (Phelps y Floros, 1991; Sugahara et al., 1992), conejo (Auten et al., 1990), ratón (Korfhagen et al., 1992) y perro (Weaver y Whitsett, 1991). En el hombre se ha podido detectar expresión en las células epiteliales bronquiales de Clara en algunos casos (Auten et al., 1990), pero no en otros (Phelps y Floros, 1991). Estudios recientes muestran que existe expresión de la SP-A en algunas células traqueales y glándulas submucosas de este epitelio en pulmones de fetos humanos en el segundo trimestre de desarrollo. También se produce expresión de la SP-A en células del epitelio bronquial y glándulas del mismo (Khor et al., 1993). Asimismo, Endo y Oka (1991) detectaron expresión de la SP-A en glándulas del epitelio bronquial en pulmones de fetos y adultos humanos. No se ha detectado expresión de la SP-A en ningún otro tipo celular distinto de los anteriores en ninguna de las especies estudiadas.

Se han caracterizado tres genes que codifican para la SP-A humana. Dos de ellos se expresan (White et al., 1985; Katyal et al., 1992), mientras que el tercero es un pseudogén

(Korfhagen et al., 1991). Se ha demostrado que sólo existe un gen para la SP-A en el genoma de conejo (Boggaram et al., 1988), rata (Fisher et al., 1988 b) y ratón (Korfhagen et al., 1992). En esta última especie el gen se localiza en el cromosoma 14 (Moore et al., 1992).

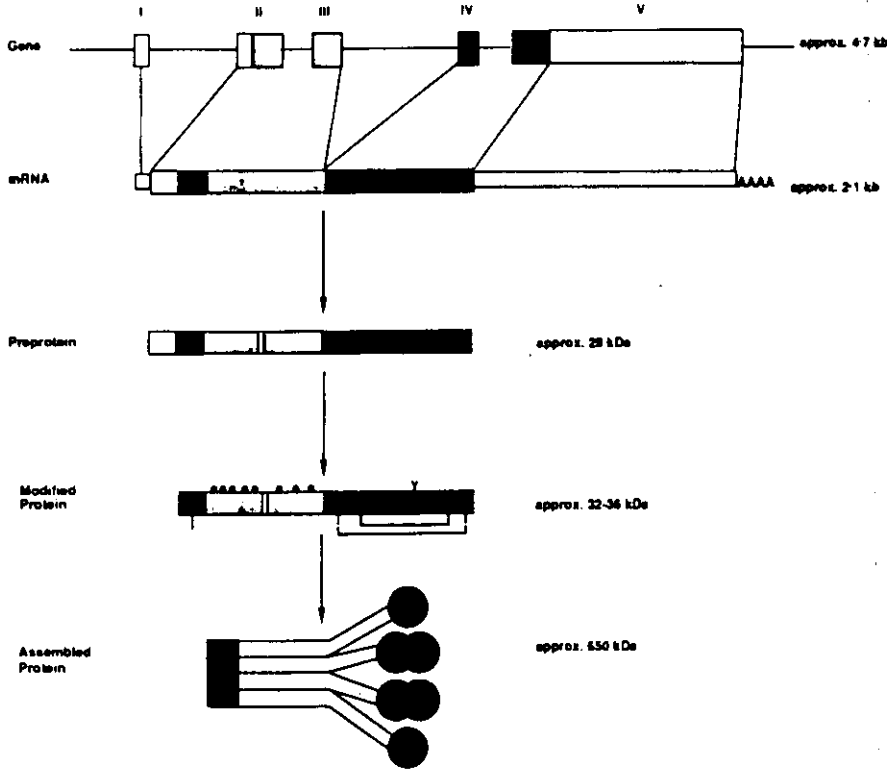
Se han aislado dos cDNA para la SP-A humana (Floros et al., 1986). Entre ellos existen sólo diferencias que resultan de la sustitución de 6 aminoácidos, localizados preferentemente en la región N-terminal de la molécula. La SP-A humana está codificada por un gen de 4.5 Kb en el brazo largo del cromosoma 10 (Bruns et al., 1987; Fisher et al., 1987) (Figura 12). El gen consta de 5 exones. La organización es semejante a la del gen de la proteína que une manosa (MBP), también presente en el cromosoma 10 (Sastry et al., 1989).

El gen de la SP-A codifica un mRNA de 2.2 Kb en la proteína humana (Ballard et al., 1986) y en la de perro (Benson et al., 1985). Sin embargo, se han detectado varios mRNA en distintas especies. Así, en la rata existen dos mRNA de 1.6 y 0.9 Kb (Sano et al., 1987 c; Fisher et al 1988 b), en el conejo dos de 2.0 y 3.0Kb (Boggaram et al., 1986) y en el ratón tres mRNA de 3.0, 1.7 y 1.0 Kb (Korfhagen et al., 1990). En todos los mRNA de la misma especie las regiones codificadoras son idénticas. Sólo se diferencian en la distinta poliadenilación de las regiones no codificadoras.

Todavía no se tiene un conocimiento detallado del procesamiento de la SP-A en los neumocitos tipo II. Los datos de los que se dispone indican que la SP-A se sintetiza en los ribosomas unidos al retículo endoplasmático. El péptido señal de la SP-A dirige probablemente el transporte hacia el lumen del retículo endoplasmático, ya que una forma truncada de SP-A que carece de siete aminoácidos en el extremo N-terminal se acumula en el citoplasma de los neumocitos tipo II (Alcorn y Mendelson, 1993).

La proteína sufre modificaciones co y post-traduccionales. Se ha observado "in vitro" la N-acetilación co-traducciona de la SP-A humana (Floros et al., 1986) y de la SP-A de rata (Weaver et al., 1986). La SP-A se glicosila y sulfata (Weaver et al., 1987). "In vitro", se ha demostrado la carboxilación de glutámicos dependiente de vitamina K en cultivos de neumocitos tipo II (Rannels et al., 1987). Tanto la acetilación como la sulfatación o carboxilación de residuos de ácido glutámico de la SP-A se han detectado por métodos indirectos, sin que se haya demostrado la existencia de estas modificaciones en las proteínas nativas.

Otra modificación es la hidroxilación de prolinas, reacción catalizada por la prolilhidroxilasa (Freedman, 1989) e imprescindible para la formación de una triple hélice de colágeno estable. En presencia de inhibidores de esta enzima, la SP-A se acumula en el



**FIGURA 12. Representación esquemática de la organización del gen de la SP-A humana.**

Los exones se representan por rectángulos. Las regiones que codifican para el dominio colagénico aparecen sombreadas, mientras que las regiones no colagénicas son oscuras. Y indica el sitio de glicosilación y los círculos llenos las posiciones de las hidroxiprolinas. Los cisteínas que participan en la formación de puentes disulfuro intracatenarios de la región tipo lectina aparecen unidas por líneas. Tomado de Hawgood, 1989.

retículo, posiblemente debido a un incorrecto proceso de ensamblaje de los multímeros (O'Reilly et al., 1988; Persson et al., 1988). Para este correcto ensamblaje se requiere además la formación de puentes disulfuro intercatenarios en la región N-terminal de la SP-A. La reacción es catalizada por una enzima, la proteína disulfuro isomerasa, que constituye la subunidad  $\beta$  de la prolilhidroxilasa (Freedman, 1989). El tránsito de la SP-A a través del



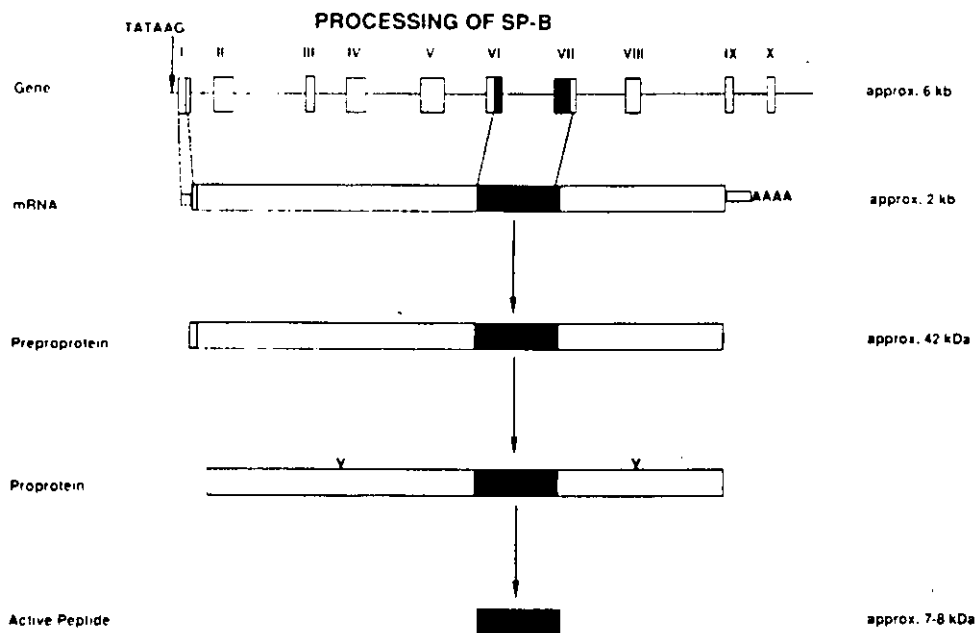
retículo endoplasmático es lento, probablemente como consecuencia del proceso complejo de estructuración tridimensional de la proteína requerido para la formación de la triple hélice de colágeno y posterior ensamblaje de los 6 protómeros.

### SP-B

Esta proteína se expresa en los neumocitos tipo II y en las células alveolares bronquiales de Clara en el hombre (Phelps y Floros, 1988; Auten et al., 1990; Stahlman et al., 1992), conejo (Auten et al., 1990), rata (Phelps y Floros, 1991) y ratón (D'Amore-Bruno et al., 1991). Asimismo, se ha detectado expresión de la proteína en algunas vías aéreas proximales (D'Amore-Bruno et al., 1991) y localización de SP-B por métodos inmunohistoquímicos en los bronquios y la tráquea (Stahlman et al., 1992).

El gen de la SP-B humana se encuentra en el cromosoma 2 (Emrie et al., 1988; Pilot-Matias et al., 1989). El gen de la SP-B humana consta de 9.5 Kb, y está distribuido en 11 exones (Figura 13). Sólo se ha detectado un mRNA de 2.0 Kb para la proteína humana (Glasser et al., 1987), 1.9 Kb para la proteína de conejo (Xu et al., 1989), 1.5 Kb para la de rata (Emrie et al., 1989) y 1.6 Kb para la de ratón (D'Amore-Bruno et al., 1991). La traducción del mRNA produce una proteína precursora de la SP-B de 381 aminoácidos en el hombre (Glasser et al., 1987; Jacobs et al., 1987; Pilot-Matias et al., 1989), 376 aminoácidos en la SP-B de rata (Emrie et al., 1989) y 370 en la SP-B de conejo (Xu et al., 1989).

El procesamiento de la SP-B humana incluye la eliminación de fragmentos de 180 y 102 aminoácidos de los extremos N-terminal y C-terminal de la proteína precursora y se realiza mediante al menos dos rupturas proteolíticas, porque se han detectado en los neumocitos tipo II formas intermedias de 26 kDa (Weaver y Whitsett, 1989). Los sitios de ruptura no están marcados por aminoácidos básicos, sino por un par de glutaminas. El procesamiento no es completo, y aparecen cantidades significativas de preproteína y formas intermedias en medios de cultivo de neumocitos tipo II (Hawgood y Schiffer, 1991). Sin embargo, en los cuerpos lamelares sólo aparece la forma madura (Weaver y Whitsett, 1989). Estudios recientes muestran que el precursor podría procesarse en los cuerpos multivesiculares, previamente a su incorporación en los cuerpos lamelares, y que la enzima implicada podría ser la cathepsina D (Weaver y Voorhout, 1994).



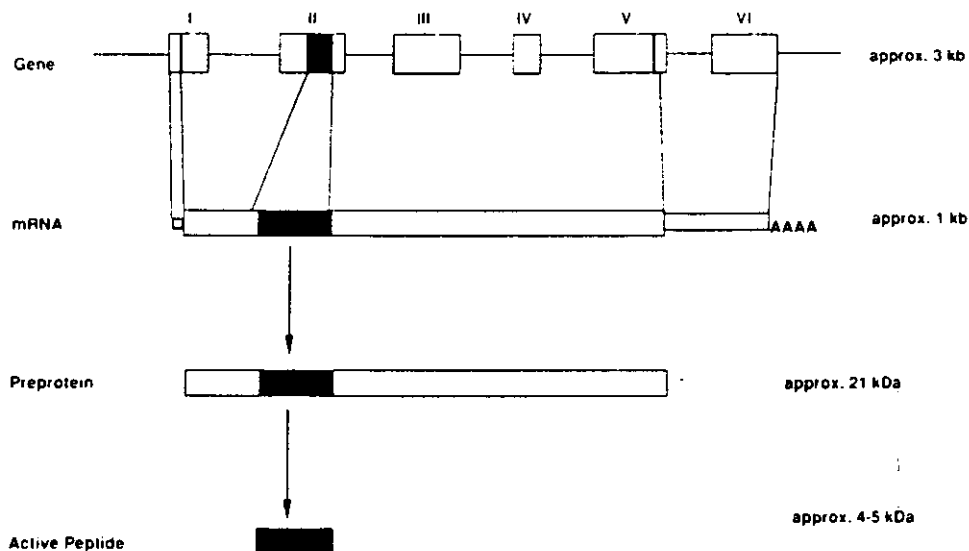
**FIGURA 13. Representación esquemática del gen de la SP-B humana y del procesamiento hasta formar la forma madura de la proteína.**

Los exones se representan mediante rectángulos. Las regiones que codifican para la forma madura de la proteína aparecen de color negro. Y indica posibles sitios de glicosilación. Tomado de Hawgood, 1989.

## SP-C

Se expresa únicamente en los neumocitos tipo II (Fisher et al., 1989; Liley et al., 1988; Shannon et al., 1990; Phelps y Floros, 1991).

Dos genes codifican para la SP-C humana. Probablemente se trata de alelos (Glasser et al., 1988 b). Se localizan en el brazo corto del cromosoma 8 (Fisher et al., 1988 a) y se diferencian sólo en 19 nucleótidos. Ambos se transcriben (Glasser et al., 1988 a, b). El gen de la SP-C humana está formado por 2.7 Kb (Glasser et al., 1988 b) y está constituido por 6 exones (Figura 14).



**FIGURA 14. Representación esquemática del gen de la SP-C humana y el procesamiento hasta la formación del péptido activo.**

Los exones se representan mediante rectángulos y las regiones que codifican para la forma madura aparecen de color oscuro. Tomado de Hawgood, 1989.

Mediante "splicing" diferencial del primer transcrito de la SP-C humana aparecen varios mRNAs (Warr et al., 1987; Glasser et al., 1988 a, b).

La traducción del RNA produce una proteína precursora de 197 aminoácidos en la SP-C humana (Warr et al., 1987; Glasser et al., 1988 a, b), 194 aminoácidos en la SP-C de rata (Fisher et al., 1989) y 190 en la SP-C de perro (Fisher et al., 1989).

El procesamiento de la SP-C incluye la eliminación de 23-25 y 133-139 residuos de los extremos N-terminal y C-terminal del precursor respectivamente. Asimismo, incluye la adición post-traducciona de ácido palmítico a los residuos de cisteína. A diferencia de lo que ocurre con la SP-B, no se ha detectado la presencia del precursor en el medio extracelular de cultivos de neumocitos tipo II (Beers y Fisher, 1992). Keller y colaboradores, (1991) utilizando un sistema de traducción "in vitro", observan que el precursor puede ser

una proteína integral de membrana, con el extremo N-terminal hacia el citoplasma, mientras que el extremo C-terminal se expone hacia la luz del retículo endoplasmático. La secuencia que corresponde a la SP-C madura serviría de señal, así como de dominio de interacción con la bicapa. Estos autores muestran que se libera un fragmento del extremo N-terminal del precursor en presencia de membranas microsomales. Por tanto, la integración en las membranas microsomales con la liberación de un fragmento N-terminal podrían ser etapas en el procesamiento de la SP-C. Es posible que la palmitoilación ocurra en el aparato de Golgi (Beers y Fisher, 1992).

### SP-D

Se ha detectado la presencia de SP-D marcada con oro coloidal tanto en neumocitos tipo II como en las células epiteliales bronquiales tipo Clara. En estas últimas el marcaje aparece en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi, así como en gránulos secretorios. En los neumocitos tipo II aparece en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi. No se ha detectado, sin embargo, en los cuerpos lamelares (Voorhout et al., 1992).

### 1.5.2. ENSAMBLAJE EN LOS CUERPOS LAMELARES

Los cuerpos lamelares son el orgánulo de almacenamiento intracelular del surfactante. Su composición lipídica es semejante a la obtenida mediante lavado broncoalveolar (Schlame et al., 1988; Casals et al., 1989; 1990). No se conoce de modo definitivo su composición proteica. La SP-D no se ha detectado en los cuerpos lamelares ni en la mielina tubular mediante marcaje con oro coloidal (Voorhout et al., 1992). Mediante la utilización de anticuerpos específicos, se ha demostrado la presencia de SP-A y SP-B en los cuerpos lamelares (Walker et al., 1986; Snyder y Mendelson, 1987; Weaver et al., 1988; Williams et al., 1988). Asimismo, se ha observado la presencia de SP-C en los cuerpos lamelares mediante "Western-Blot" (Farrell et al., 1990).

Cuando se observan mediante microscopía electrónica los cuerpos lamelares, aparecen como lamelas lipídicas concéntricas rodeadas por una membrana limitante. Se ve una zona central electrondensa, donde presumiblemente se encuentran las proteínas hidrofóbicas. También se observa material amorfo entre las lamelas y debajo de la membrana limitante (Williams, 1977; 1982). El análisis de resonancia magnética nuclear de

fracciones de cuerpos lamelares aislados revela un bajo contenido de agua, lo que supone un estado de baja hidratación del surfactante intracelular (Grathwohl et al., 1979).

Los cuerpos lamelares contienen enzimas hidrolasas de origen lisosomal (Hook y Gilmore 1982; de Vries et al., 1985 b). Una  $\alpha$ -glucosidasa no precipitable con concanavalina A, a diferencia de la  $\alpha$ -glucosidasa lisosomal, podría ser específica de los cuerpos lamelares (de Vries et al., 1985 b). Los cuerpos lamelares mantienen un pH ácido (Chander et al., 1986) y tienen un alto contenido en calcio (Eckenhoff y Somlyo, 1988).

No se conoce cómo se originan los cuerpos lamelares. Chevallier y Collet (1972) utilizando precursores de la síntesis de lípidos y proteínas marcados radiactivamente y técnicas de autorradiografía, observaron marcaje de [ $^3\text{H}$ ] colina en el retículo endoplasmático, después en el aparato de Golgi y finalmente en los cuerpos lamelares. El marcaje de [ $^3\text{H}$ ] leucina aparecía primero en el retículo endoplasmático, y posteriormente en el aparato de Golgi, cuerpos multivesiculares y cuerpos lamelares. No se conoce el mecanismo por el cual se transportan los componentes lipídico y proteico del surfactante pulmonar desde el retículo endoplasmático hasta los cuerpos lamelares. Respecto al componente lipídico, se supone que podrían intervenir dos mecanismos distintos:

- Transporte mediado por proteínas intercambiadoras de fosfolípidos. Se ha sugerido que las proteínas intercambiadoras de fosfolípidos podrían estar implicadas en la transferencia intracelular de lípidos surfactantes (Fisher y Chander, 1985). Es interesante comentar que el citosol de los neumocitos tipo II está enriquecido en proteínas que intercambian PC y PG si se compara con el citosol obtenido de pulmón entero (Post et al., 1980; Pool et al., 1983). Sin embargo, no se ha demostrado la existencia de proteínas intercambiadoras específicas para determinadas especies moleculares (Fisher y Chander, 1985) que justifiquen el enriquecimiento en DPPC de los cuerpos lamelares respecto a otros sistemas de membrana de los neumocitos tipo II (Schlame et al., 1988).
- Transporte vesicular. Mediante estudios isotópicos se puso de manifiesto que los fosfolípidos surfactantes se mueven temporalmente a través de una serie de partículas subcelulares de mayor densidad a otras de densidad inferior, los cuerpos lamelares (Jobe et al., 1981). Magoon y colaboradores (1983) han aislado dos poblaciones de cuerpos lamelares que se diferencian por su relación lípido/proteína. Mediante estudios de incorporación de marcaje han observado

que los cuerpos lamelares pequeños, más densos, se convierten en cuerpos lamelares menos densos.

No se sabe prácticamente nada del proceso de ensamblaje de las proteínas en los cuerpos lamelares. Mediante la utilización de [ $^3\text{H}$ ] leucina, Chevallier y Collet (1972) observaron la aparición de marcaje en el retículo endoplasmático, que migraba posteriormente a través del aparato de Golgi, hasta los cuerpos multivesiculares, que se fusionaban con los cuerpos lamelares. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la incorporación de [ $^3\text{H}$ ] leucina no es específica del surfactante pulmonar. Se ha detectado la presencia de precursores de la SP-B en los cuerpos multivesiculares, mientras que en los cuerpos lamelares sólo aparece la forma madura de la proteína, lo que sugiere que existe una sucesión temporal entre ambos orgánulos (Weaver y Whitsett, 1992). Se desconoce dónde se produce el ensamblaje de la SP-A y los fosfolípidos. Algunos investigadores han publicado que los cuerpos lamelares tienen un alto contenido en SP-A (Snyder y Mendelson, 1987; O'Reilly et al., 1988), mientras que otros autores sostienen que el contenido de SP-A de los cuerpos lamelares es mucho menor que el que existe en el surfactante extracelular (Oosterlaan-Dijksterhuis et al., 1991 b; Froh et al., 1990;). Cuando se inyectan a ratas precursores de la síntesis de proteínas y fosfolípidos, la cinética de aparición de SP-A y DPPC en el lavado broncoalveolar es semejante. Por tanto, es posible que existan dos vías de secreción de la SP-A. Una de ellas necesita el ensamblaje con lípidos y las proteínas hidrofóbicas en los cuerpos lamelares. La otra se produciría por medio de otras vesículas de secreción distintas de los cuerpos lamelares. No se conoce bien cuál es la señal que dirige a la proteína en su tráfico intracelular. La proteína parece secretarse correctamente en presencia de inhibidores del procesamiento de los carbohidratos (Whitsett et al., 1985; O'Reilly et al., 1988). Sin embargo, la glicosilación de la SP-A parece ser imprescindible para el transporte de la proteína a los cuerpos lamelares (Alcorn y Mendelson, 1993).

### 1.5.3. SECRECIÓN DEL SURFACTANTE PULMONAR

La secreción del surfactante se produce por exocitosis, mediante la fusión de la membrana limitante de los cuerpos lamelares con la membrana plasmática de los neumocitos tipo II. Se ha estimado que el 10-15 % de los cuerpos lamelares se secretan en una hora (Kliwer et al., 1985).

### 1.5.3.1. Estimulación de la secreción por mediadores químicos locales

Distintos agentes farmacológicos estimulan la secreción del surfactante "in vitro":

- Agentes purinérgicos. La adenosina, análogos de adenosina y nucleótidos de adenina estimulan la secreción del surfactante por cultivos de neumocitos tipo II (Gilfillan y Rooney, 1987 a, b; 1988; Warburton et al., 1989; Gobran y Rooney, 1990; Griese et al., 1991 a, c). Asimismo, la secreción "in vivo" es estimulada por adenosina (Ekelund et al., 1985) y se inhibe por antagonistas de adenosina (Rooney y Gobran, 1988). Tanto los receptores  $P_1$  como  $P_2$  intervienen en la regulación de la secreción del surfactante. La adenosina estimula la secreción a través de la interacción con receptores  $P_1$  (subtipo  $A_2$ ). Sin embargo, no está establecido definitivamente a través de qué receptores ejerce su acción el ATP. Griese y colaboradores (1991, c) observaron que más del 75% del efecto del ATP sobre la secreción de PC por los neumocitos tipo II se inhibía en presencia de antagonistas  $P_1$ , lo que sugiere que el ATP estimula la secreción a través de esos receptores. Sin embargo, también se ha encontrado activación a través de receptores  $P_2$  (Gilfillan y Rooney, 1988; Warburton et al., 1989). También se ha caracterizado, al menos parcialmente, el mecanismo de transducción de señales que regula la secreción del surfactante "in vitro" por agentes purinérgicos. Los receptores  $P_1$  están acoplados a la actividad adenilato ciclasa y ejercen su acción mediante el control de los niveles de AMPc (Warburton et al., 1989; Gobran y Rooney, 1990; Griese et al., 1993), mientras que los receptores  $P_2$  intervienen en la activación de la fosfolipasa C (Warburton et al., 1989; Rice et al., 1990), lo que implica movilización de calcio intracelular (Rice y Singleton, 1987; Dorn et al., 1989; Rice et al., 1990) y activación de la proteína quinasa C (Rice et al., 1990).
- Proteína quinasa C. Podría estar implicada en la regulación de la secreción del surfactante. Activadores de esta proteína, como el TPA y diacilglicerol, estimulan la secreción del surfactante por cultivos de neumocitos tipo II (Sano et al., 1987 a; Gobran y Rooney, 1990; Murata et al., 1993).
- Agonistas adrenérgicos. Estos agentes ejercen un efecto estimulador directo sobre la secreción del surfactante vía receptores de tipo  $\beta$  (Brown y Longmore, 1981; Chander, 1989). En los neumocitos tipo II existen tanto receptores  $\beta_1$

- como  $\beta_2$  y ambos parecen implicados en la regulación de la secreción del surfactante (Kai et al., 1992). El mecanismo de transducción de la señal parece implicar activación del sistema adenilato ciclasa y elevación de los niveles de AMPc (Brown y Longmore, 1981; Gilfillan y Rooney, 1987 b).
- Calcio. El aumento de la concentración de calcio en el citoplasma inducido por diversos agonistas podría mediar el proceso de secreción. En este sentido, se ha descrito que ionóforos de calcio estimulan la secreción de PC por cultivos de neumocitos tipo II (Sano et al., 1987 b). Asimismo, el lantano, un ion que bloquea la entrada de calcio en las células, inhibe la secreción de surfactante estimulada por distensión pulmonar y lavado broncoalveolar, en conejos recién nacidos (Corbet y Owens, 1991; Corbet et al., 1991).
  - Vasopresina. Estimula la secreción del surfactante "in vitro" a través de la interacción con receptores AVP, probablemente mediante la activación de la fosfolipasa C, producción de inositol trifosfato y diacilglicerol, y subsiguiente activación de la proteína quinasa C (Brown y Wood, 1989; Brown y Chen, 1990).
  - Regulación colinérgica. Parece ejercerse a través de una vía indirecta. Diversos estudios muestran que agonistas colinérgicos estimulan la secreción del surfactante en sistemas de pulmones perfundidos aislados. La respuesta puede bloquearse mediante tratamiento con propanolol, antagonista  $\beta$ -adrenérgico (Massaro et al., 1982). Los resultados obtenidos en cultivos de neumocitos tipo II ponen en entredicho el efecto estimulante de los agonistas colinérgicos, puesto que en estos casos no se ha observado incremento de la secreción del surfactante en presencia de agonistas colinérgicos (Brown y Longmore, 1981).
  - Histamina. Parece estimular la secreción del surfactante por los neumocitos tipo II. Su acción se ejerce a través de receptores  $H_2$ , acoplados a la activación del sistema adenilato ciclasa y a la elevación de los niveles de AMPc (Chen y Brown, 1990).
  - Derivados del ácido araquidónico. El ácido araquidónico y sus derivados incrementan la secreción del surfactante por los neumocitos tipo II (Gilfillan y Rooney, 1985; 1986). Parece claro el papel desempeñado por los leucotrienos en la regulación de la secreción del surfactante. Se ha demostrado que inducen



un incremento en la secreción de surfactante tanto en cultivos de neumocitos tipo II (Gilfillan y Rooney, 1986) como "in vivo", en pulmones de conejos recién nacidos (Rooney y Gobran, 1988). Sin embargo, existe controversia acerca de la importancia de las prostaglandinas sobre la regulación de la secreción del surfactante. En estudios "in vitro" la respuesta de los neumocitos tipo II a las prostaglandinas fue casi inapreciable (Taylor et al., 1979). Sin embargo, las prostaglandinas  $E_2$  ejercen un efecto estimulador sobre la secreción del surfactante en cortes de pulmón de conejo recién nacidos (Marino y Rooney, 1988).

#### **1.5.3.2. Estimulación por factores mecánicos**

La hiperventilación estimula la secreción de surfactante tanto "in vivo" (Nicholas y Barr, 1983; Barr et al., 1988) como "in vitro", utilizando cultivos de neumocitos tipo II sometidos a ciclos de dilatación y contracción mecánica (Wirtz y Dobbs, 1990 a, b; Wirtz y Schmidt, 1992). El mecanismo a través del cual se produce la estimulación mecánica no se conoce, pero se ha propuesto que la alcalosis subsiguiente a la disminución de la presión parcial de  $CO_2$  podría ser la causa. La ventilación pulmonar con aire que contiene 0% de  $CO_2$  incrementa la secreción en un sistema de pulmón perfundido aislado (Chander, 1989). El efecto se revierte incorporando ácidos débiles como acetato o butirato 25 mM en el medio utilizado para perfundir los pulmones.

#### **1.5.3.3. Inhibición de la secreción de surfactante por mediadores químicos locales**

La sustancia P (Rice y Singleton, 1986) y la adenosina, a través de la interacción con receptores  $A_2$  (Gobran y Rooney, 1990), inhiben la secreción del surfactante pulmonar.

#### **1.5.3.4. Inhibición de la secreción por la SP-A**

La SP-A inhibe la secreción del surfactante pulmonar por los neumocitos tipo II, tanto la secreción basal como la estimulada por secretagogos (Dobbs et al., 1987; Rice et al., 1987; Kuroki et al., 1988 a, b). La inhibición se puede revertir añadiendo al medio de cultivo de las células anticuerpos anti-SP-A, desnaturalizando térmicamente la proteína o mediante

reducción y alquilación de la SP-A (Dobbs et al., 1987; Rice et al., 1987; Kuroki y Akino, 1988 a, b). Sin embargo, la desglicosilación de la SP-A (Kuroki et al., 1988 a), o el tratamiento con colagenasa bacteriana (Murata et al., 1993) no impiden la acción de la SP-A sobre la secreción del surfactante. Recientemente, Murata y colaboradores (1993) han publicado que un anticuerpo monoclonal anti-SP-A, cuyo epítipo se localiza en el dominio C-terminal de la SP-A anula por completo la actividad inhibidora de la SP-A sobre la secreción del surfactante y la capacidad de SP-A no marcada de competir con  $^{125}\text{I}$ -SP-A por la unión a la superficie de los neumocitos tipo II. El fragmento resistente a colagenasa (CRF) inhibe la secreción del surfactante por los neumocitos tipo II y compite con  $^{125}\text{I}$ -SP-A por la unión a las células, aunque a concentraciones superiores a la SP-A.

La acción de la SP-A parece ejercerse a través de la interacción con un receptor de membrana de los neumocitos tipo II (Kuroki et al., 1988 c; Wright et al., 1989). Recientemente, Strayer y colaboradores (1993) han encontrado una proteína de membrana de los neumocitos tipo II de 30 kDa de masa molecular y que se une a la SP-A. Esta proteína no se expresa en los macrófagos alveolares. A diferencia de la unión a los neumocitos tipo II, la unión de la SP-A a los macrófagos alveolares sí se inhibe tras el tratamiento con colagenasa bacteriana (Pison et al., 1992), lo que podría indicar que la unión de la SP-A a los dos tipos celulares, neumocitos tipo II y macrófagos alveolares, podría ejercerse a través de la interacción con dos tipos de receptores distintos.

#### 1.5.4 METABOLISMO EXTRACELULAR

La dinámica y las transformaciones que sufre el surfactante al ser secretado al espacio alveolar están todavía sin resolver. Se sabe que el surfactante se encuentra en varias formas físicas en el alveolo y en el lavado broncoalveolar: estructuras multilamelares, redes membranosas de mielina tubular, vesículas uni y multilamelares, estructuras discoidales y finalmente una monocapa de fosfolípidos superficial. Mediante centrifugación diferencial (Thet et al., 1979; Magoon et al., 1983; Baritussio et al., 1984) o centrifugación en gradiente de densidad (Gross y Narine, 1989) se recuperan tres fracciones:

- ligera, formada por vesículas uni y multilamelares.
- pesada, formada por mielina tubular.
- ultrapesada, constituida por mielina tubular en asociación con estructuras semejantes a los cuerpos lamelares.

Las vesículas uni y multilamelares contienen pocas proteínas y tienen poca capacidad de reducir la tensión superficial. Las otras formas contienen proteínas y son activas funcionalmente (Gross y Narine, 1989). Mediante marcaje con [1,2,3-<sup>3</sup>H]-glicerol, precursor de la síntesis de fosfolípidos, se observa que, después de la secreción, aparecen secuencialmente formas ultrapesadas que evolucionan hacia formas menos densas. Por otra parte, mediante microscopía electrónica se observa que el contenido de los cuerpos lamelares secretados se transforma en mielina tubular (Williams, 1977; 1982). Estos estudios apoyan la hipótesis de que el contenido de los cuerpos lamelares se transforma en mielina tubular, que es precursora de una monocapa de DPPC en la interfase aire-líquido (Figura). El material que no se adsorbe en la interfase aire-líquido o el que se excluye de la monocapa aparece como vesículas que posteriormente serán capturadas por los neumocitos tipo II y los macrófagos alveolares, principalmente. Gross y Schultz (1990) reprodujeron la secuencia de formas extracelulares del surfactante que probablemente ocurre en el alveolo, "in vitro", mediante experimentos en los que cíclicamente se aumenta y disminuye el área ocupada por el surfactante en unos tubos sometidos a cambios de posición vertical a horizontal. Estos autores demostraron que la transformación de formas de densidad semejante a la de los cuerpos lamelares, a otras de densidad semejante a la de la mielina tubular, depende sólo de las variaciones de volumen aplicadas y de la existencia de una interfase aire-líquido, ya que las transformaciones no se producen cuando se completa el volumen del tubo con surfactante, impidiendo por tanto la existencia en ellos de interfase aire-líquido. Sin embargo, la transformación a formas de densidad semejante a las vesículas depende además de una actividad serín-proteasa, denominada por ellos convertasa, parcialmente caracterizada. La convertasa probablemente se trata de una proteína de 80 kDa, con un pH óptimo de 7.4 y que se aísla junto con el surfactante (Gross y Schultz, 1992). La incubación de esta proteína con N-glicosidasa F reduce la masa molecular aparente a 72 kDa, lo que sugiere que podría tratarse de una glicoproteína (Gross, 1994). La enzima es activa en ausencia de calcio. No se ha encontrado todavía el sustrato de esta enzima, aunque se especula que podría tratarse de alguna proteína específica del surfactante.

No se conoce con exactitud la composición de la mielina tubular. En experimentos "in vitro" se han podido reconstruir figuras semejantes a las de la mielina tubular a partir de mezclas de DPPC/PG, SP-A, SP-B y calcio (Suzuki et al., 1989; Williams et al., 1991; Poulain et al., 1992). Las mezclas que contienen además SP-C también forman figuras semejantes a las de la mielina tubular, pero esta proteína no es imprescindible para la formación de dicha estructura. La adición de EDTA inhibe la formación de mielina tubular, lo que indica el absoluto requerimiento de calcio (Suzuki et al., 1989; Williams et al., 1991).

La mielina tubular parece tener un mayor contenido de SP-A que otras formas de surfactante (Wright et al., 1984). Voorhout y colaboradores (1991) observaron, mediante marcaje con oro coloidal, que la mielina tubular presenta una mayor cantidad de SP-A que los cuerpos lamelares recién secretados.

La mielina tubular es probablemente la precursora de la monocapa que se forma en la interfase aire-líquido. Numerosos resultados experimentales apoyan esta posibilidad. Magoon y colaboradores (1983) separaron mediante centrifugación diferencial distintas fracciones del surfactante y encontraron que las que se adsorbían más rápidamente a la interfase también estaban enriquecidas en mielina tubular. Resultados similares obtuvieron Benson y colaboradores (1984) y Gross y Narine (1989). Sin embargo, otros autores no han encontrado una rápida velocidad de adsorción de muestras de mielina tubular y sostienen que se trata de material inactivo que se excluye de la interfase aire-líquido (Sen et al., 1988).

#### **1.5.5. RECAPTURA Y REUTILIZACION DEL SURFACTANTE PULMONAR**

El material surfactante debe ser retirado del alveolo una vez transcurrido su periodo de vida media. Debe, por tanto, existir un fino equilibrio entre la secreción del surfactante y su eliminación de los espacios alveolares.

El surfactante pulmonar puede eliminarse del alveolo a través de varias rutas:

- transporte por las vías aéreas hacia el exterior.
- transporte vía sistema circulatorio o linfático.
- fagocitosis y degradación por los macrófagos alveolares.
- reincorporación por los neumocitos tipo II y posterior degradación y/o reutilización.

Numerosos resultados experimentales apoyan la idea de que la internación del material lipoproteico por los macrófagos alveolares y sobre todo por los neumocitos tipo II constituyen las rutas principales de eliminación del surfactante de la luz alveolar (Magoon et al., 1983; Jacobs et al., 1985; Rider et al., 1992).

Los macrófagos alveolares incorporan material surfactante. Se ha estimado que un 20% del complejo se incorpora a estas células (Rider et al., 1992). Tanto los lípidos (Miles

et al., 1988; Gräbner et al., 1991; Young et al., 1993), como la SP-A (Coalson et al., 1986; Young et al., 1993) y la SP-C (Baritussio et al., 1989) aparecen en las vesículas fagocíticas de estas células tras la incubación de los macrófagos con surfactante pulmonar. Cuando se aislaron los macrófagos de animales a los que previamente se había administrado surfactante marcado radioactivamente, no se obtiene marcaje asociado a los macrófagos, lo que sugiere que estas células degradan el surfactante y liberan los productos de degradación al alveolo (Pettenazzo et al., 1988). Un estudio reciente de Rider y colaboradores (1992) confirma esta posibilidad, pues muestra la acumulación de un análogo no metabolizable de DPPC, administrado junto al surfactante, en los macrófagos alveolares.

La incorporación del surfactante en los neumocitos tipo II constituye la principal ruta de eliminación de éste del alveolo (Rider et al., 1992). Los mecanismos responsables de la recaptura del surfactante y su procesamiento intracelular, así como la regulación de estos procesos no se conocen con precisión en la actualidad. Al parecer, el surfactante es internado mediante endocitosis (Williams, 1987) por un proceso dependiente de energía (Fisher et al., 1987; Griese et al., 1991 d). Una vez que se encuentra en el interior de la célula, el material puede ser:

- Degradado vía lisosomal, de forma que los productos de degradación pueden posteriormente pasar al retículo endoplasmático y servir como precursores primarios de la síntesis de nuevo material surfactante (Fisher et al., 1987; Rider et al., 1991).
- Incorporado directamente como moléculas intactas, sin sufrir ningún tipo de degradación, en cuerpos lamelares, por lo que podrían ser de nuevo secretadas a la luz alveolar (Rider et al., 1990; 1991; Young et al., 1993).

No se conoce qué factores dirigen a los fosfolípidos hacia una u otra localización: lisosomas o cuerpos lamelares. Se ha sugerido que la SP-A podría estar implicada, ya que fracciones de fosfatidilcolina incubadas en presencia de SP-A en cultivos de neumocitos tipo II se degradan menos que otras fracciones internadas en ausencia de SP-A (Wright et al., 1987). La existencia de ese transporte dirigido por la SP-A u otras proteínas es todavía una especulación.

Se conoce mucho menos acerca de la internación de las proteínas específicas del surfactante y su posterior procesamiento en la célula. La SP-A probablemente se interna a

través de un proceso de endocitosis mediada por receptor (Ryan et al., 1989; Kalina y Socher, 1990). Young y colaboradores (1989) demostraron que  $^{125}\text{I}$ -SP-A instilada en la tráquea de ratas adultas formando parte de complejos lipoproteicos aparecía posteriormente en los cuerpos lamelares de los neumocitos tipo II. La mayor parte de la SP-A migraba con la misma masa molecular que la proteína nativa, aunque en el aparato de Golgi y en los microsomas existía marcaje en péptidos de tamaño inferior (Young et al., 1989). Resultados semejantes han obtenido Snyder y colaboradores (1988) en conejos recién nacidos. Sin embargo, Ryan y colaboradores (1989), utilizando cultivos de neumocitos tipo II, apreciaron que la SP-A internada se encontraba en vesículas endocíticas y cuerpos multivesiculares, pero no en los cuerpos lamelares.

Todavía se conoce poco acerca de la internación y procesamiento de las proteínas hidrofóbicas y la SP-D. Baritussio y colaboradores (1989) instilaron una mezcla de [ $^{35}\text{S}$ ]-metionina-SP-C y  $^{32}\text{P}$ -fosfolípidos en la tráquea de conejos de 3 días de edad. El 50% de la SP-C marcada no se recuperaba mediante lavado broncoalveolar 3 horas después de la instilación. Además, la tasa  $^{32}\text{P}/^{35}\text{S}$  se incrementaba 1.9 veces frente al valor inicial, por lo que es posible que la tasa de internación de los lípidos y las proteínas sea distinta o bien que exista una menor eficacia de reutilización de la SP-C. Por el contrario, Pinto y colaboradores (1993) observaron una tasa de internación semejante para los lípidos y la SP-C. También se pudo detectar la presencia de SP-C en los cuerpos lamelares tras la internación, pero no se conoce la ruta intracelular de la proteína tras la recaptura desde el alveolo ni si la entrada de la proteína en la célula se produce como consecuencia de la interacción con un receptor de la superficie de los neumocitos tipo II.

La SP-B se une a la superficie de los neumocitos tipo II, y posteriormente es internada por estas células (Bates et al., 1992). La asociación de  $^{125}\text{I}$ -SP-B deslipidizada con la superficie de los neumocitos tipo II en cultivo ocurre a través de un proceso no saturable, y no se inhibe en presencia de un exceso de SP-B no marcada de 60 veces. Sin embargo, cuando la SP-B se añade formando parte de complejos con los lípidos del surfactante la unión ocurre a través de un proceso saturable, probablemente específico. Hay que tener en cuenta para explicar estos resultados que la SP-B agrega en soluciones acuosas, de manera que la concentración efectiva de SP-B libre para interaccionar con las células podría ser más baja de la esperada. Tras la unión a la membrana de los neumocitos tipo II, la SP-B es incorporada por estas células. Mediante autorradiografía se aprecia marcaje de la SP-B en la membrana plasmática, vesículas endocíticas, cuerpos multivesiculares y cuerpos lamelares, pero no en vesículas revestidas, lo que podría implicar que el mecanismo de internación no

es del tipo de endocitosis mediada por receptor (Breslin et al., 1992). También se aprecia marcaje de SP-B en los cuerpos lamelares en proceso de exocitosis, lo que indica que la SP-B se secreta de nuevo a la luz alveolar (Breslin et al., 1992).

Con respecto a los posibles mecanismos que regulan la internación del surfactante, Fisher y colaboradores (1985, 1987, 1989) encontraron que algunos secretagogos del surfactante pulmonar como isoproterenol, terbutalina, ATP, ésteres de forbol y análogos del AMPc estimulaban la recaptura del surfactante utilizando un modelo de pulmón perfundido aislado. Sin embargo, no se ha encontrado estimulación de la recaptura del surfactante "in vitro" por distintos secretagogos del surfactante a las concentraciones a las que se producía la máxima estimulación de la secreción. Ni el ATP ni la terbutalina, ionomicina, TPA o agonistas purinérgicos incrementan la recaptura de dipalmitoilfosfatidilcolina por los neumocitos tipo II en cultivo (Griese et al., 1991 d).

En estudios "in vitro" se ha observado que la SP-A incrementa la recaptura de lípidos por neumocitos tipo II y macrófagos alveolares, en un proceso dependiente de la temperatura y de la concentración de proteína utilizada (Wright et al., 1987; Rice et al 1989; Griese et al., 1991 d). Otras lectinas, como la aglutinina de *Maclura pomifera* también incrementa la internación de dipalmitoilfosfatidilcolina por los neumocitos tipo II (Griese et al., 1991 d)

También se ha publicado que las proteínas hidrofóbicas estimulan la recaptura de fosfolípidos del surfactante. Claypool y colaboradores (1984 a, b) demostraron que una fracción de surfactante soluble en disolventes orgánicos, y que contenía las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C, aumentaba la internación de lípidos del surfactante por los neumocitos tipo II. Un estudio de Bates y colaboradores (1989) sugiere que el fosfatidilglicerol presente en esa fracción podría ser el responsable de la activación. Sin embargo, Rice y colaboradores (1989) mostraron que tanto la SP-B como la SP-C estimulaban la recaptura de fosfatidilcolina por los neumocitos tipo II. El proceso no es específico de estas células, sino que también se producía sobre los macrófagos alveolares y fibroblastos de pulmón. No existía saturación y la activación ocurría a 4 y a 37 °C. No se sabe si existe realmente estimulación de la recaptura de los lípidos del surfactante por las proteínas hidrofóbicas o si su acción se produce modificando la forma física de los liposomas, favoreciendo una interacción de los mismos con lípidos de las membranas de las células.

## **OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

El conocimiento de las interacciones moleculares que se establecen en el surfactante pulmonar es imprescindible para una correcta comprensión del ciclo metabólico, tanto intracelular como extracelular del complejo, con vistas a una aplicación terapéutica a pacientes con Síndrome de Distrés Respiratorio del Neonato o Síndrome de Distrés Respiratorio del Adulto. Para establecer las bases moleculares del complejo ciclo del surfactante, que conduce en último término, a la formación de una monocapa de DPPC en la interfase aire-líquido, es imprescindible el estudio de las interacciones entre la SP-A y los fosfolípidos, y que alteraciones se producen en unos y otra como consecuencia de la interacción. Asimismo, las interacciones que se puedan establecer entre las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C con los fosfolípidos, y de aquéllas con la SP-A pueden determinar la función biológica del surfactante.

Con vistas al esclarecimiento de algunos de estos aspectos, se han desarrollado los siguientes estudios:

- *Caracterización estructural de la SP-A de cerdo.*
- *Efecto del calcio, la fuerza iónica y el pH ácido sobre la estructura de la SP-A de cerdo.*
- *Estudio de la interacción de la SP-A de cerdo y humana procedente de pacientes con proteinosis alveolar con vesículas de fosfolípidos.*
- *Estudios de actividad de la SP-A de cerdo. Factores que controlan la agregación de vesículas inducida por la SP-A. Efecto de las proteínas hidrofóbicas sobre la capacidad de agregación de vesículas de la SP-A. Efecto del pH ácido.*

## **MATERIALES Y METODOS**

### 3.1 MATERIALES

El material biológico se obtuvo de cerdos sacrificados en un matadero industrial. Los pulmones utilizados en este estudio se extrajeron junto con la tráquea, y se seleccionaron posteriormente, desechando aquellos que presentaran fisuras. Los órganos se mantuvieron en hielo durante 1 hora hasta la obtención de los lavados broncoalveolares.

La SP-A humana, aislada a partir de lavados broncoalveolares de pacientes de proteinosis alveolar, fue suministrada por los profesores Van Golde y Haagsman, de la Universidad de Utrecht, Holanda.

Los fosfolípidos sintéticos 1,2-dimiristoil-sn-glicero 3-fosfoglicerol (DMPG), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero 3-fosfocolina (DPPC) y 1,2-dipalmitoil-sn-glicero 3-fosfoglicerol (DPPG), procedieron de Avanti Polar Lipids (Birmingham).

Los fosfolípidos 1-palmitoil-sn-glicero 3-fosfocolina (LPC), 1,2-diacil-sn-glicero 3-fosfocolina (PC), 1,2-diacil-sn-glicero 3-fosfoglicerol (PG) procedieron de Sigma Co. (St. Louis, EEUU). Los disolventes orgánicos utilizados para disolverlos fueron de calidad HPLC y fueron suministrados por Scharlau (España).

Trizma Base, N-acetil-triptofanamida (NATA), DL-ditiotreitol, albúmina de suero bovino y los patrones de peso molecular utilizados en el análisis electroforético procedieron de Sigma Co. (St. Louis, EEUU). Los marcadores de electroforesis de bajo peso molecular preteñidos fueron suministrados por Bethesda Research Laboratories (Bethesda, MD). La tripsina utilizada en los experimentos de proteólisis procedió de Millipore (Bedford, EEUU). El tampón Hepes, el detergente n-octil- $\beta$ -D-glucopiranosido y la enzima utilizada para la desglicosilación de la SP-A, N-glicosidasa F de *Flavobacterium meningosepticum*, fueron suministrados por Boehringer (Manheim, RFA). Los reactivos de electroforesis acrilamida, N-N'-metilén-bisacrilamida y dodecilsulfato sódico (SDS) procedieron de Serva (Heidelberg, RFA). El n-butanol utilizado en el aislamiento de la SP-A procedió de Panreac (España). El azul de bromofenol se obtuvo de Fluka (Suiza). Los geles de cromatografía Sephadex LH-20 y LH-60 fueron de Pharmacia (Suecia).

Todos los demás reactivos y disolventes no especificados proceden de Merck (Darmstadt, RFA) y poseen calidad analítica.

### **3.2. AISLAMIENTO DEL SURFACTANTE PULMONAR Y PURIFICACION DEL SURFACTANTE CONTAMINADO POR COMPONENTES PLASMATICOS**

Los pulmones de cerdo se lavaron vía traqueal con una solución 0.15 M de NaCl, pH 6.9, a 4°C. El lavado broncoalveolar (LBA) obtenido se filtró a través de gasa doble, y se centrifugó a 480 x g durante 5 minutos a 4°C en una centrífuga Sorvall RC2B, con el fin de eliminar los macrófagos alveolares y desechos celulares existentes en el fluido. El lavado broncoalveolar se congeló a -20°C, hasta su posterior utilización.

El surfactante pulmonar se aisló de acuerdo con un método puesto a punto en nuestro laboratorio (Casals et al., 1989) (Figura 15). El lavado broncoalveolar libre de células se centrifugó a 105000 x g durante 2 horas a 4°C en una ultracentrífuga Beckman L-5. El sedimento así obtenido se resuspendió en una solución de NaBr al 16% en NaCl 0.15 M. Sobre esta capa se colocaron otras de NaBr al 13% en NaCl 0.15 M, y NaCl 0.15 M, y se centrifugó a 116000 x g durante 2 horas a 4°C en una ultracentrífuga Beckman L-5. El surfactante purificado se recogió en la interfase NaCl 0.15 M/NaBr 13%. Se tomaron alícuotas para valoración de proteínas. El resto se congeló en nitrógeno líquido, y se mantuvo a -80°C hasta su utilización.

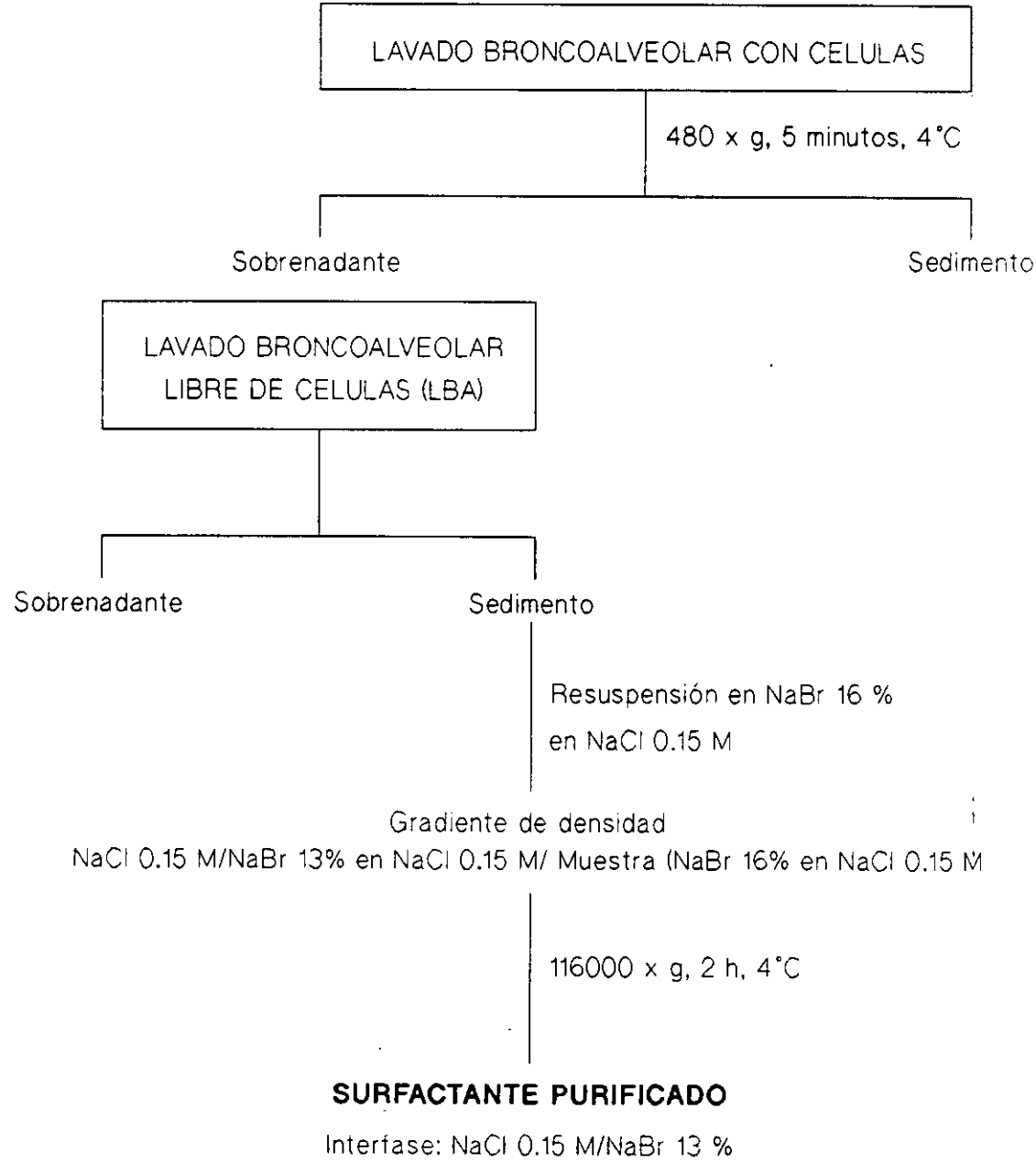


FIGURA 15. Esquema del aislamiento de surfactante pulmonar de pulmón de cerdo.

### **3.3. CUANTIFICACION DE LAS PROTEINAS Y FOSFOLIPIDOS DEL SURFACTANTE**

#### **3.3.1. VALORACION DE PROTEINAS**

La concentración de proteínas se ha estimado de acuerdo con el método de Lowry (1959), utilizando albúmina de suero bovino como patrón. Las muestras de lavado broncoalveolar libre de células y surfactante pulmonar, debido a su elevada concentración de lípidos, se valoraron en presencia de SDS al 3% (Dulley y Grieve, 1975). A causa de la baja concentración de proteína obtenida, se redujeron los volúmenes de todos los reactivos empleados a 1/5 de los utilizados en el método de Lowry convencional.

#### **3.3.2 DETERMINACION CUANTITATIVA DE FOSFOLIPIDOS**

Se llevó a cabo mediante la valoración de fósforo de las distintas clases de fosfolípidos, según el método de Rouser (Rouser et al., 1966). Las muestras de surfactante purificado de contaminación plasmática se transfirieron a tubos de hidrólisis y, una vez eliminado completamente el disolvente, se adicionaron 0.45 ml de ácido perclórico al 70%. Los tubos se introdujeron en un baño de arena a 250°C durante 25 minutos, dejándolos enfriar a continuación a temperatura ambiente. Para la valoración colorimétrica del fosfato inorgánico liberado en la reacción anterior, se añadieron 3.5 ml de agua destilada, 0.5 ml de molibdato amónico al 2.5% y 0.5 ml de ácido ascórbico al 10%. La reacción transcurrió durante 7 minutos en un baño de agua en ebullición, y se detuvo por la inmersión de los tubos en hielo. El molibdato amónico forma un complejo con el fósforo que se reduce por el ácido ascórbico, dando un compuesto coloreado. La lectura se realiza en un espectrofotómetro Beckman DU-70 a 820 nm. La cantidad de fósforo se determinó interpolando los valores de absorbancia obtenidos en una recta patrón de fosfato inorgánico, realizada en las mismas condiciones. El método permite detectar entre 3 y 23 nmoles de fosfolípidos por muestra. En algunas ocasiones se redujeron los volúmenes de todos los reactivos empleados para detectar entre 0.2 y 2.9 nmoles de fosfolípidos por muestra.

### 3.4. AISLAMIENTO DE LAS PROTEINAS ESPECIFICAS DEL SURFACTANTE

#### 3.4.1. AISLAMIENTO DE LA SP-A

La proteína se ha aislado de acuerdo con el método de Haagsman (1987) (Figura 16). El surfactante pulmonar purificado se inyectó lentamente en n-butanol (20:1 mL de butanol/mg de proteína). La suspensión se mantuvo en agitación durante 30 minutos previamente a su centrifugación a 3000 x g durante 30 minutos a 15°C en una centrífuga Sorvall RC2B. Se utilizó un rotor flotante HB-4. El sobrenadante de esta centrifugación contenía los lípidos y las proteínas hidrofóbicas del surfactante. La fracción insoluble en n-butanol se recogió en el precipitado, que se sometió a corriente de nitrógeno hasta la total eliminación del disolvente. Posteriormente se resuspendió en un tampón Hepes 10 mM, pH 7.4, que contenía n-octil- $\beta$ -D-glucopiranosido 20 mM y NaCl 0.15 M (Tampón OGP), y se centrifugó a 13400 x g durante 30 minutos a 15°C en una ultracentrífuga Beckman L-5 utilizando un rotor flotante SW-40. El precipitado se resuspendió en el mismo tampón y se repitió la centrifugación. El segundo precipitado se resuspendió en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, y se dializó durante 20 horas frente al mismo tampón a temperatura ambiente. El contenido de la bolsa de diálisis se centrifugó a 100000 x g durante 30 minutos a 4°C en una ultracentrífuga Beckman L-5. El sobrenadante de dicha centrifugación contenía la SP-A purificada. Como criterio de pureza negativo se utilizó la separación electroforética de la muestra en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

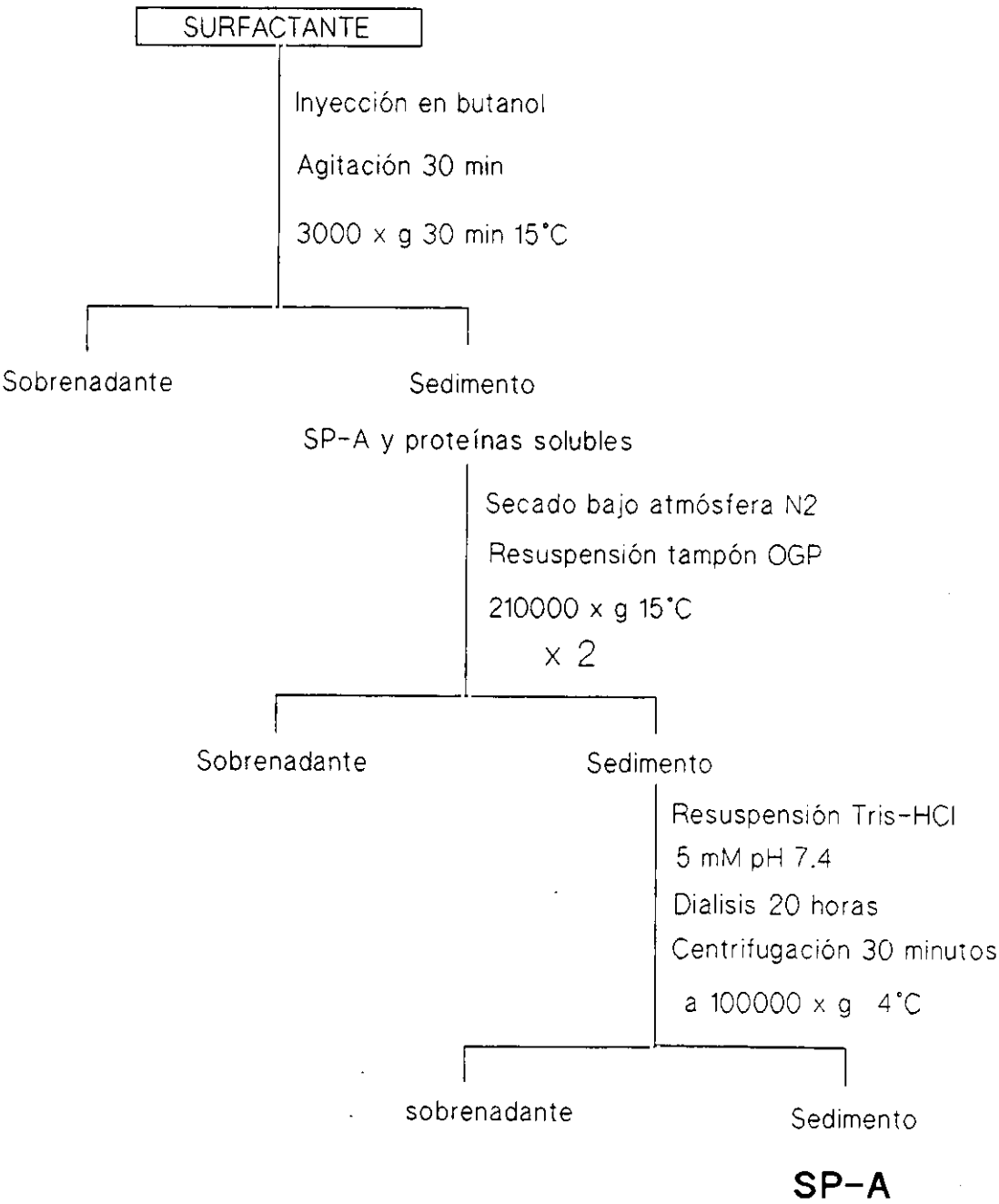


FIGURA 16: Esquema del aislamiento de la SP-A de pulmón de cerdo.



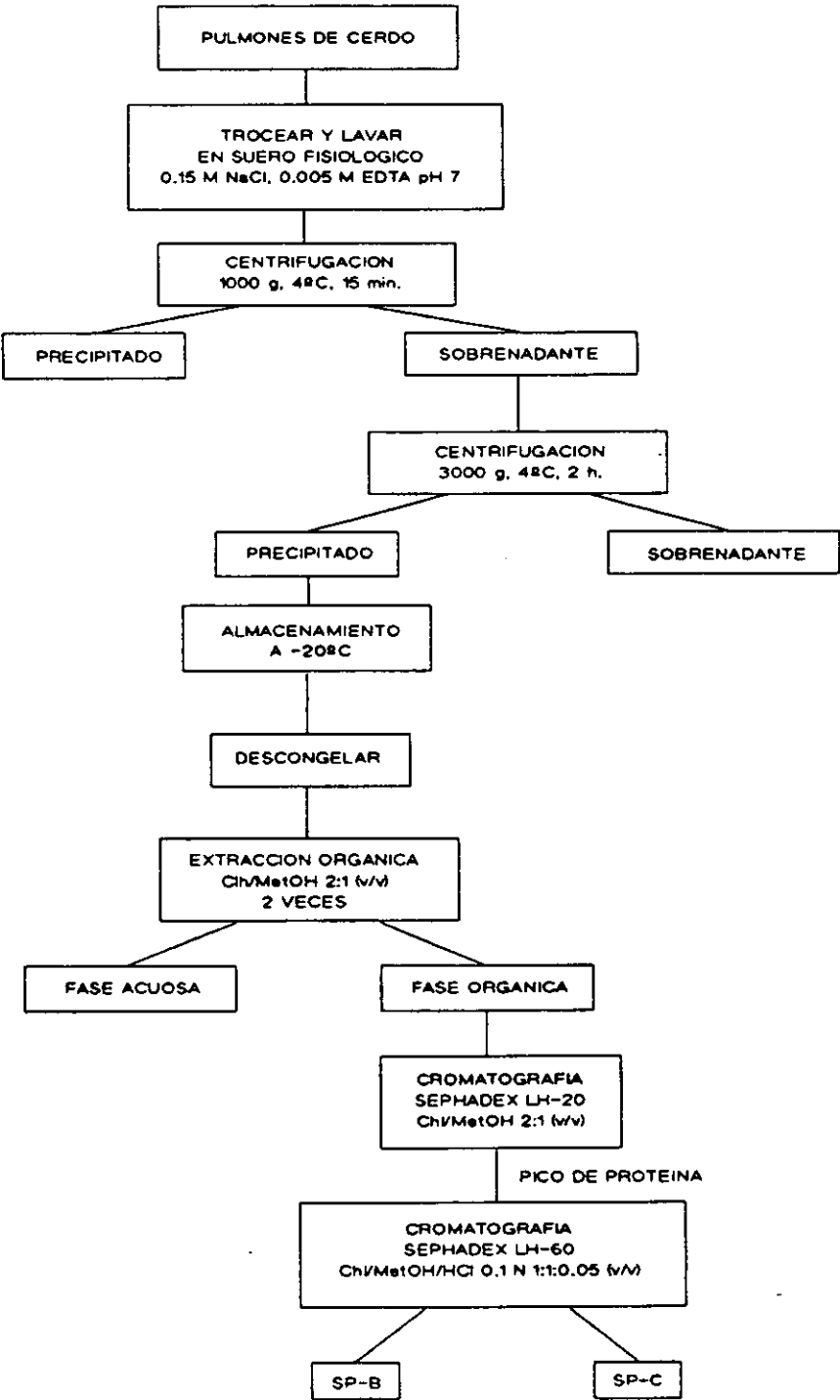
### 3.4.2. AISLAMIENTO DE LAS PROTEINAS HIDROFOBICAS SP-B y SP-C

Las proteínas hidrofóbicas del surfactante SP-B y SP-C se aislaron y purificaron a partir de pulmones de cerdo según el método de Cursted y colaboradores (1987), con algunas modificaciones que mejoran la separación de las proteínas hidrofóbicas de los lípidos y de éstas entre sí (Pérez-Gil et al., 1993) (Figura 17).

Los pulmones de cerdo se trocearon y se lavaron con una solución 0.15 M NaCl, 0.005 M EDTA, pH 7.0 (1 litro/1 Kg de pulmón). Los trozos de pulmón se agitaron y comprimieron para conseguir la transferencia de la mayor cantidad posible de surfactante a la solución salina. El material biológico no se homogeiniza para evitar la contaminación con material intracelular.

El lavado así obtenido se filtró a través de una gasa y se centrifugó a 1000 x g, a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante que resulta de esta centrifugación se recogió y se volvió a centrifugar, esta vez a 3000 x g, a 4°C durante 2 horas. El precipitado así obtenido contiene los lípidos y proteínas del surfactante pulmonar. Este precipitado se almacenó a -20°C hasta ser utilizado.

Las proteínas hidrofóbicas del surfactante se aislaron a partir de los extractos orgánicos de los precipitados, sometidos a una típica extracción lipídica por el método de Bligh y Dyer (1959) modificado brevemente. Se adicionó 1 volumen de cloroformo y otro de metanol a los precipitados, tomando como referencia el volumen que éstos ocupan. Después de agitar exhaustivamente en vórtex, se formó un sistema bifásico, extrayéndose la fase orgánica (inferior) y lavándose la acuosa (superior) con un volumen de cloroformo/metanol 2:1 (V/V). Los extractos orgánicos reunidos se lavaron con KCl 0.15 M (añadiendo un 25% del volumen de las fases orgánicas reunidas), y la fase orgánica, una vez extraída, se concentró hasta un volumen aproximado de 0.5 ml bajo corriente de N<sub>2</sub>. Este volumen se aplica en una columna cromatográfica de Sephadex LH-20 (75 x 2cm) equilibrada con cloroformo/metanol 2:1 (V/V). Se recogieron fracciones de 2 ml en un colector, y se obtuvo un perfil de elución por medidas de absorbancia a 240 y 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-70. El pico que contiene proteína se volvió a concentrar hasta un volumen de



**FIGURA 17:** Esquema del aislamiento de las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C de pulmón de cerdo.

0.25 ml bajo flujo de  $N_2$ , y se aplicó en una columna de Sephadex LH-60 (80 x 1.5 cm), equilibrada con cloroformo/metanol/HCl 0.1 N (1:1:0.05, V/V/V). Se recogieron fracciones de 0.5 ml, construyéndose el perfil de elución midiendo absorbancia a 240 y 280 nm. Los picos de SP-B y SP-C se reunieron y se almacenaron a - 20°C hasta ser utilizados.

### 3.5. ANALISIS Y CUANTIFICACION DE LAS PROTEINAS DEL SURFACTANTE

#### 3.5.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS

##### 3.5.1.1. SP-A

La proteína aislada se analizó mediante electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y condiciones reductoras (Laemli, 1970). Los geles concentrante y separador utilizados se prepararon con una concentración de acrilamida del 4% y 12% (P/V) respectivamente. El disolvente de las muestras se secó a vacío en una centrífuga Speed Vac Concentrator (Savant Ynd, NY, EEUU) y las muestras se redisolviéron en 20  $\mu$ L de tampón Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, que contenía glicerol 10% (P/V), SDS 2.3% (P/V), ditiotreitól 60 mM y azul de bromofenol. Normalmente se aplicaron 5-10  $\mu$ g de proteína. Asimismo, se aplicaron 30  $\mu$ l de una solución de proteínas marcadoras de masa molecular conocida y disueltas en el mismo tampón que las muestras a una concentración de 1 mg/ml. Las proteínas marcadoras utilizadas fueron albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), pepsina (34.7 kDa), tripsinógeno (24 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18.4 kDa) y lisozima (14.3 kDa). Inmediatamente antes de su aplicación en el gel, las muestras se calentaron a 100°C durante 2 minutos.

La electroforesis se desarrolló a una corriente constante de 15 mA/gel. Bajo estas condiciones el voltaje aumenta gradualmente. La electroforesis se realiza en una cubeta Mini-Protean II (Bio-Rad). La fuente de alimentación utilizada fue de BIO-RAD Model 1000/500. Los geles se revelaron con una solución 0.0125% (P/V) de azul de Coomassie R-250, 50% (V/V) de metanol y 10% (V/V) de ácido acético durante al menos 12 horas. Tras este

tratamiento se colocaron en una solución de destañido I que contiene 50% (V/V) de metanol y 10% (V/V) de ácido acético durante 2 horas. Posteriormente se mantuvieron en una solución de destañido II que contiene 5% (V/V) de metanol y 7% (V/V) de ácido acético durante un tiempo indefinido hasta fotografiarse o secarse.

### 3.5.1.2. SP-B y SP-C

El análisis de la pureza de las proteínas hidrofóbicas aisladas se realizó, al igual que la SP-A, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, según el método de Laemli (Laemli, 1970). El gel concentrante se preparó con una concentración de 4% de acrilamida y el gel separador con una concentración de 18%. Las muestras se disolvieron en un tampón que contiene glicerol 10%, Tris-ClH 0.0625M, SDS 2.3%, pH 6.8, en condiciones no reductoras y reductoras (añadiendo  $\beta$ -mercaptoetanol 5% al tampón de aplicación), se hirvieron a 100°C durante 2 minutos y se aplicaron. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 60 V para el gel concentrante y de 160 en el gel separador. Las proteínas se detectaron por el método de tinción de plata descrito por Oakley y colaboradores (1980).

### 3.5.2. CUANTIFICACION DE LAS PROTEINAS DEL SURFACTANTE PULMONAR

La cuantificación de las proteínas del surfactante se ha realizado mediante análisis cuantitativo de aminoácidos. Las muestras se hidrolizaron mediante la adición de 0.2 ml de HCl azeótropo 5.7 N con fenol 0.1% (P/V). Como patrón interno se utilizó el aminoácido no proteico nor-leucina. Los tubos se cerraron a vacío y se incubaron a 110°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se abrieron, y el HCl se eliminó en un desecador a vacío con NaOH, y se lavaron dos veces con 0.1 ml de agua destilada. Las muestras se secaron a vacío en una centrífuga Speed Vac Concentrator (Savant Ynd NY, EEUU). El análisis se realizó de manera automática en un analizador de aminoácidos Beckman System 6300 High Performance. Para la SP-A de pulmón de cerdo la cantidad de proteína se calculó a partir de la secuencia de aminoácidos de la SP-A humana (White et al., 1985). La estimación de la cantidad de proteína se ha realizado utilizando los residuos Asx, Thr, Glx, Gly, Ala y Val.

La cuantificación de las proteínas hidrofóbicas se realizó mediante el mismo análisis de aminoácidos. Se comprobó que para valorar la cantidad de proteína, la mejor estimación la proporcionaban los residuos Glx, Ala, Tyr, Phe y Lys para la SP-B; y Asx, Ala, Lys y Arg para la SP-C.

### **3.6. ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y DE MODIFICACION QUIMICA DE LA SP-A**

#### **3.6.1. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA**

Todos los estudios de fluorescencia incluidos en esta memoria se han realizado en un espectrofluorímetro Perkin Elmer MPF-44E trabajando en el modo "ratio", en condiciones de uso de un fotomultiplicador de referencia, de forma que operando siempre a un mismo voltaje (- 750 V), todos los espectros obtenidos para una misma longitud de onda de excitación son perfectamente comparables entre sí. Se han utilizado cubetas de 0.2 cm de paso óptico. Las anchuras de rendija utilizadas fueron de 7 y 5 nm para los haces de excitación y emisión respectivamente. Los espectros se registraron desde 285 a 400 nm, con una velocidad de barrido de 1 nm/sec. Las muestras se termostataron a 20, 37 o 45°C mediante un baño Lauda RM-3.

Los espectros de fluorescencia de la SP-A se registraron a 20 o 37°C en 0.3 ml de tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, a una concentración final de SP-A de 6.7-10 µg/ml. Se utilizaron como longitudes de onda de excitación 275 nm para registrar el espectro de fluorescencia total de la proteína, y 295 nm para excitar selectivamente los residuos de triptófanos. Para analizar la contribución de los residuos de tirosina y triptófano al espectro total de la SP-A se ha excitado la proteína a 295 nm. El espectro obtenido se normalizó respecto al registrado excitando a 275 nm, considerando que la emisión de fluorescencia a longitudes de onda superiores a 380 nm se debe exclusivamente a la emisión de los residuos de triptófano (Eisinger, 1969). El espectro normalizado es el de la emisión de los residuos de triptófano de la SP-A. La diferencia entre el espectro registrado excitando a 275 nm y el espectro normalizado de emisión de los triptófanos corresponde a la contribución de las tirosinas al espectro total de la SP-A.

Paralelamente, y en las mismas condiciones, se registró el espectro del tampón utilizado en cada experimento para obtener el pico Raman del agua. Esta banda se restó de cada espectro antes de representar los datos.

### 3.6.2. ESPECTROS DE DICROISMO CIRCULAR

Todos los espectros de Dicroísmo Circular incluidos en esta memoria se registraron en un dicrógrafo Ivon Mark III equipado con una lámpara de xenon de 250 W. Las disoluciones de proteína se analizaron en cubetas de 0.1 cm de paso óptico. Los espectros se registraron en el ultravioleta lejano (250-200 nm), con una velocidad de barrido de 0.2 nm/segundo. Se acumularon cinco espectros para promediar el efecto del ruido. Previamente se procedió al trazado de una línea base colocando en la cubeta del dicrógrafo el mismo volumen del tampón utilizado para disolver la proteína. Los resultados se expresan en elipticidad molar por residuo ( $\text{grados cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ), considerando para la SP-A 110 como el peso molecular medio por residuo. La concentración de proteína se estimó mediante análisis de aminoácidos.

### 3.6.3 COMPOSICION DE AMINOACIDOS

El contenido en triptófano de la SP-A se ha calculado de acuerdo con el método de Beaven y Holiday (1952). Para ello se preparó una disolución de SP-A en NaOH 0.1 N cuya absorción a 290 nm estuvo comprendida entre 0.2 y 0.5. Se determinó la absorción de esta disolución a 294.4 nm. El contenido en triptófano se calculó a partir de la ecuación:

$$M_{\text{tyr}}/M_{\text{trp}} = (0.592 A_{294.4} - 0.263 A_{280}) / (0.263 A_{280} - 0.170 A_{294.4})$$

donde  $M_{\text{tyr}}$  y  $M_{\text{trp}}$  corresponden a los moles de tirosina y triptófano por mol de proteína que existen en la SP-A respectivamente. La concentración molar de tirosinas se calculó mediante hidrólisis ácida en las condiciones descritas en el apartado 3.5.2.

El contenido de cisteína se determinó como ácido cisteico de acuerdo con el método de Hirs (1967):

En primer lugar se procedió a la preparación del ácido perfórmico, tomando cantidades de agua oxigenada y ácido fórmico al 99% en proporción 1:9. Esta mezcla se mantuvo a 25°C durante 2.5 horas. A continuación se llevó a -10°C y se mantuvo a esa temperatura durante 20 minutos.

Posteriormente, la muestra de SP-A se redisolvió en 200 µl de ácido perfórmico preparado en las condiciones descritas previamente, y se incubó a -10°C durante 2.5 horas. El ácido se eliminó a vacío en una centrífuga Speed Vac. Las muestras oxidadas se sometieron a hidrólisis ácida según el método descrito en el apartado 5.2 durante 24 horas. Paralelamente se trató en las mismas condiciones una muestra de lisozima de clara de huevo, de composición de aminoácidos conocida, para comprobar la eficacia de la oxidación.

El contenido del resto de los aminoácidos se determinó mediante hidrólisis ácida en las condiciones descritas previamente. Se realizaron hidrólisis durante periodos de tiempo más largos, como 48 y 72 horas para determinar el contenido en treonina, serina, valina e isoleucina.

#### 3.6.4. DESGLICOSILACION DE LA SP-A

La desglucosilación de la SP-A se realizó mediante tratamiento de la proteína con N-glicosidasa F de *Flavobacterium meningosepticum* (Boehringer 913782) a 37°C durante 24 horas. La reacción de desglucosilación se llevó a cabo en tampón fosfato 15 mM, pH 7.4, que contenía 12 mM EDTA, 20 mM n-octil-β-glucopiranosido (OGP), fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMFS) 1.5 mM, azida sódica (0.02%, P/V) y 45 unidades de enzima/mg de SP-A. En todos los experimentos se incluyeron blancos que contenían SP-A y el resto de componentes de la mezcla de incubación, a excepción de la enzima. Finalizada la incubación, el detergente (OGP), EDTA y otros componentes de bajo peso molecular se eliminaron mediante diálisis de la mezcla de reacción frente a tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, durante 48 horas a 4°C. La eficacia de la reacción de desglucosilación se controló mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, de acuerdo con las condiciones descritas previamente.

### **3.7. CAMBIOS ESTRUCTURALES INDUCIDOS POR CALCIO, FUERZA IONICA Y PH ACIDO**

#### **3.7.1. ESTUDIOS DE AUTOAGREGACION DEPENDIENTE DE CALCIO, FUERZA IONICA O PH ACIDO**

##### **3.7.1.1. Cinética**

La autoasociación de la SP-A se ha ensayado midiendo absorbancia a 360 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-8 equipado con un portacubetas termostatzado. Los ensayos se realizaron a 37° C. Se utilizaron cubetas de 1 cm de paso óptico. El experimento se inició adicionando a las cubetas de muestra y referencia 0.3 ml del tampón utilizado. Después de 10 minutos, se añadió la SP-A en la cubeta de muestra. En la cubeta de referencia se añadió el mismo volumen de tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, en el que está disuelta la SP-A. La concentración de la SP-A fue de 43 µg/ml o superior. La absorbancia se midió durante 10 minutos con intervalos entre lecturas de 1 minuto. La autoagregación de la proteína comenzó tras la adición de una alícuota de una solución stock de CaCl<sub>2</sub> en las cubetas de muestra y referencia para conseguir una concentración en el medio 5 mM. El incremento de absorbancia se midió durante otro periodo de 10 minutos. Finalmente la agregación se revirtió adicionando una alícuota de una solución concentrada de EDTA para conseguir una concentración 10 mM.

##### **3.7.1.2. Titulación con calcio**

Los experimentos se han realizado en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior, pero tras la adición de la SP-A, y transcurridos 10 minutos, se adicionaron sucesivas alícuotas de una solución concentrada de CaCl<sub>2</sub> con intervalos de tiempo entre adiciones sucesivas de 7 minutos.



### 3.7.2. ESTUDIOS ESPECTROSCOPICOS

#### 3.7.2.1. Espectros de fluorescencia

El estudio del efecto de la presencia y ausencia de calcio, pH ácido y fuerza iónica en el espectro de fluorescencia de la SP-A se ha llevado a cabo a 20°C en las mismas condiciones descritas en el apartado 3.6.1. y disolviendo la SP-A en los siguientes tampones:

- Tris-HCl 5 mM, pH 7.4
- Tris-HCL 5 mM, EDTA 1mM, pH 7.4
- Tris-HCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 5mM, pH 7.4
- Tris-HCl 5 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4
- Tris-HCl 25 mM, Acetato sódico 25 mM, pH 4.5

La longitud de onda de excitación utilizada fue 295 nm para excitar selectivamente los residuos de triptófano.

##### *3.7.2.1.1. Variación de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de calcio o cloruro sódico*

Los ensayos de titulación con calcio o cloruro sódico se realizaron a 20°C a una longitud de onda de excitación de 275 nm. La SP-A se disolvió en 0.3 ml de tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 (concentración final 10µg/ml). Después de 10 minutos a 20°C, se adicionaron sucesivas alícuotas de una solución concentrada de CaCl<sub>2</sub> 0.3 M o de NaCl 2M preparadas en el mismo tampón. El intervalo de tiempo entre la adición de las sucesivas alícuotas de calcio o de NaCl fue de 3 minutos. Paralelamente se realizaron experimentos control, adicionando a la proteína los mismos volúmenes de agua destilada, para corregir la disminución de intensidad de fluorescencia provocada por la dilución

### 3.7.2.1.2. Apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la SP-A por acrilamida

Se registraron en las mismas condiciones experimentales descritas en el apartado 3.6.1, pero utilizando como longitud de onda de excitación 295 nm para excitar selectivamente los residuos de triptófano y para reducir la absorbancia de la acrilamida. Los espectros de fluorescencia se registraron antes y después de añadir alícuotas sucesivas de una disolución concentrada de acrilamida en agua destilada (2M o 5M). Paralelamente se registraron espectros en las mismas condiciones añadiendo alícuotas de agua destilada para obtener la variación de intensidad de fluorescencia debida a dilución. La dispersión provocada por la adición de las alícuotas de acrilamida se corrigió añadiendo alícuotas semejantes de este agente a 0.3 ml de tampón 5mM Tris-ClH, pH 7.4. La absorbancia de las muestras a 295 nm y 330 nm se midió a 20°C en un espectrofotómetro Beckman DU-8 equipado con un portacubetas termostatzado. El efecto de filtro interno se corrigió de acuerdo con la expresión  $F_c = F_m \times 10^{(A_{em} + A_{ex})/2}$  (Lakowicz, 1983) donde  $F_c$  y  $F_m$  son las intensidades de emisión de fluorescencia corregida y medida directamente, respectivamente.  $A_{em}$  y  $A_{ex}$  son la absorbancia de la muestra a las longitudes de onda de emisión y excitación, 330 y 295 nm, respectivamente.

Los resultados se analizaron de acuerdo con la ecuación de Stern-Volmer para el apagamiento colisional (Eftink y Ghiron 1981):

$$F_0/F = 1 + K_w [Q]$$

donde  $F_0$  y  $F$  son las intensidades de emisión de fluorescencia medidas en ausencia y presencia de acrilamida respectivamente,  $Q$  es la concentración de acrilamida existente en el medio, y  $K_w$  es la constante de Stern-Volmer que da cuenta de la mayor o menor accesibilidad de los residuos fluorescentes al agente de "quenching". Representando  $F_0/F$  frente a la concentración de acrilamida se obtuvo  $K_w$  a partir de la pendiente de la recta obtenida.

### 3.7.2.2. Espectros de Dicroísmo Circular

Se han realizado de acuerdo con las condiciones descritas en el apartado 3.6.2.. Para estudiar la influencia del calcio en concentraciones micromolares se compararon los espectros de dicroísmo circular de la SP-A en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, en presencia o ausencia de EDTA 1 mM. Para estudiar la influencia del calcio en concentraciones milimolares o de la fuerza iónica sobre el espectro de dicroísmo circular de la SP-A se registraron los espectros de la proteína en tampón Tris-HCl 5mM, pH 7.4. A continuación se añadieron alícuotas de una solución de  $\text{CaCl}_2$  0.075 M o de una solución de NaCl 2M en Tris-HCl 5mM, pH 7.4. Se registraron los espectros de la SP-A después de cada adición. Igualmente se trazaron líneas base a las que se añadieron alícuotas semejantes de  $\text{CaCl}_2$  y NaCl. Después de realizado el experimento se tomaron alícuotas para valoración de proteínas mediante análisis de aminoácidos antes y después de centrifugar a 3000 r.p.m. en una centrífuga Wifug para descartar la posible precipitación de la proteína debida a agregación.

Para analizar el efecto del pH ácido sobre el espectro de dicroísmo circular de la SP-A se registró el espectro de la proteína en tampón Tris-HCl 25 mM, Acetato sódico 25 mM, pH 4.5. Una vez trazado el espectro se añadió 3  $\mu\text{l}$  de una solución de NaOH 0.1 N para cambiar el pH de ácido a neutro, registrándose a continuación el espectro de la SP-A después del cambio de pH.

### 3.7.3. SUSCEPTIBILIDAD A LA HIDROLISIS POR TRIPSINA

Los ensayos de digestión de la SP-A con tripsina se realizaron incubando 5  $\mu\text{g}$  de SP-A con 750 ng de tripsina en un volumen final de 14  $\mu\text{l}$  de tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 en ausencia o presencia de a) EDTA 1 mM, b)  $\text{CaCl}_2$  5 mM, c) NaCl 150 mM.

Las mezclas se incubaron a 37°C durante 6 horas. La reacción se detuvo por la adición de tampón Tris-HCl 0.125 M, 20% glicerol (P/V), 4% SDS (P/V), pH 6.8. Las muestras se calentaron a 100°C durante 2 minutos, y se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de acuerdo con las condiciones descritas previamente.

### **3.8. ESTUDIOS DEL EFECTO DE LOS LIPIDOS SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA SP-A**

#### **3.8.1. PREPARACION DE VESICULAS FOSFOLIPIDICAS**

Las vesículas de fosfolípidos se prepararon tomando la cantidad necesaria de cada fosfolípido disuelto en cloroformo: metanol, 2:1 (V/V). Posteriormente se evaporó completamente el disolvente bajo atmósfera de nitrógeno, y los tubos se mantuvieron a vacío toda la noche en un desecador, con el fin de asegurar la total ausencia de trazas de solvente orgánico. Las diferentes vesículas fosfolipídicas se prepararon a una concentración de 1 o 3 mg/ml mediante hidratación de la película de fosfolípidos en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, que contenía NaCl 150 mM durante 1 hora a una temperatura superior a la temperatura de transición de fase del fosfolípido correspondiente. Las dispersiones resultantes se sonicaron a 240 W mediante 10 pulsos de 30 segundos, con intervalos de 15 segundos entre los pulsos, en un sonicador MSE Sonic Power Instruments provisto de una sonda de titanio de 15 cm de longitud y 2 mm de diámetro mínimo. La temperatura de sonicación fue de 4°C para PC, LPC y PG y de 45°C para DPPC, DPPG, DPPC/DPPG y DPPC/PG, y de 37°C para DMPG. La solución obtenida se centrifugó en una microfuga Hetich durante 10 minutos, tomando el sobrenadante para la realización de los ensayos. Se tomaron alícuotas antes y después de centrifugar para valorar la concentración de fosfolípidos de acuerdo con el método de Rouser (1966) descrito previamente. Las vesículas se prepararon inmediatamente antes del inicio del experimento, y se mantuvieron posteriormente a la temperatura en la que se realizaron los ensayos.

El tamaño de las vesículas utilizadas se analizó mediante "quasielastic light scattering" (QEL), de acuerdo con el método de Koppel (1972). Las medidas se realizaron en un Autosizer IIc Photon Correlation Spectrometer (Malvern Instruments, G.B.) usando un láser de helio-neón como fuente de luz incidente ( $\lambda = 632.8$  nm), y operando a 5 mW. El diámetro de las vesículas fue de 160-200 nm, con un índice de polidispersidad de 0.2. Las vesículas fueron estables a lo largo del desarrollo de los experimentos.

### 3.8.2. ESTUDIOS ESPECTROSCOPICOS

#### 3.8.2.1. Experimentos de variación de la fluorescencia intrínseca de la SP-A en presencia de cantidades crecientes de vesículas fosfolípídicas.

La interacción de la SP-A con fosfolípidos se ha estudiado midiendo los cambios en el espectro de emisión de fluorescencia total de la SP-A después de la adición de diferentes tipos de vesículas de fosfolípidos o de micelas de LPC.

La proteína se adicionó a la cubeta del espectrofotómetro que contenía tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, en presencia o ausencia de NaCl 150 mM (concentración final 10 µg/ml) y se mantuvo a 37°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se registró el espectro de emisión de la proteína ( $\lambda_{exc} = 275$  nm). Posteriormente se inició el experimento de titulación mediante la adición de sucesivas alícuotas de una solución concentrada de vesículas (1 o 3 mg/ml) a la solución de proteína en la cubeta. Las lecturas de intensidad de fluorescencia se corrigieron para descartar el efecto de: i) La dilución ocasionada por la adición de las vesículas. Para ello se añadió a otra muestra de SP-A 10 µg/ml alícuotas de tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, que contenía NaCl 150 mM, el tampón utilizado para hidratar las vesículas. ii) El efecto de "scattering" provocado por los lípidos. Para ello se añadieron alícuotas de la solución de vesículas a una muestra sin SP-A del tampón utilizado en el experimento. iii) El efecto de filtro interno. Esta corrección se realizó de acuerdo con la expresión  $F_c = F_m \times 10^{(A_{em} + A_{ex})/2}$  (Lakowicz, 1983), donde  $F_c$  es la intensidad de fluorescencia corregida,  $F_m$  es la intensidad de fluorescencia medida después de la corrección del "scattering", y  $A_{em}$  y  $A_{ex}$  son las medidas de absorbancia de las soluciones a las longitudes de onda de emisión y excitación, 330 y 275 nm, respectivamente. La absorbancia de las muestras se midió durante el desarrollo de los experimentos de titulación, tras la adición de cada alícuota de fosfolípidos, en un espectrofotómetro Beckman DU-8. En todos los experimentos la absorbancia de las muestras fue inferior a 0.1.

### **3.8.2.2. Experimentos de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la SP-A por acrilamida en presencia de vesículas de fosfolípidos**

Los experimentos se han realizado de acuerdo con el método descrito en el apartado 3.7.2.1.2. Los lípidos se añadieron a la solución que contiene SP-A para conseguir una relación en peso lípido/ SP-A 4:1, que equivale a una relación molar 200:1, considerando el peso molecular del monómero de SP-A. El tampón utilizado para disolver la SP-A fue Tris-HCl 5 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4, y la temperatura de realización de los experimentos fue de 37°C. Los resultados se corrigieron para eliminar:

- 1) dilución de la SP-A
- 2) "scattering" de la solución de fosfolípidos
- 3) efecto de filtro interno

### **3.8.2.3. Espectros de Dicroísmo Circular**

Los experimentos se han realizado de acuerdo con las condiciones experimentales descritas en el apartado 3.6.2. Una vez registrado el espectro de dicroísmo circular de la SP-A en tampón Tris-HCl 5 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4, se añadieron sucesivas alícuotas de una solución de LPC o DPPC/DPPG (7:3, en peso) 3 mg/ml. Asimismo, se trazaron líneas base a las que se añadieron idénticas alícuotas de la solución de fosfolípidos.

## **3.9. ENSAYOS DE ACTIVIDAD: ESTUDIO DE LA AGREGACION DE VESICULAS LIPIDICAS INDUCIDA POR LA SP-A**

### **3.9.1. ESTUDIOS CINETICOS**

Los estudios de agregación de vesículas de fosfolípidos inducidos por la SP-A se han realizado midiendo la cinética de la variación de la absorbancia a 400 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-8 equipado con un portacubetas termostatzado. El paso óptico de las cubetas utilizadas fue de 1 cm. La temperatura de realización de los experimentos fue de

37°C. Estos experimentos se han realizado con vesículas de distinta composición fosfolípídica, a diferentes relaciones molares lípido:proteína, a diferentes fuerzas iónicas, diferentes pHs y en presencia y ausencia de EDTA. El volumen total de la disolución fue de 300 µl.

### 3.9.2. REQUERIMIENTO DE CALCIO

Los experimentos se realizaron en las mismas condiciones descritas para los estudios cinéticos. El ensayo se inició con la adición de las vesículas (21 µg de fosfolípidos) en las cubetas de muestra y referencia en tampón Tris-HCl 5 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4. Después de 10 minutos a 37°C, se añadió la SP-A (1.5 µg). Una vez estabilizada la señal de absorbancia a 400 nm, se añadieron sucesivas alícuotas de una solución stock de CaCl<sub>2</sub>, con un intervalo de tiempo de 7 minutos entre cada adición.

### 3.9.3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

El estudio de la influencia de la temperatura sobre la agregación de vesículas lipídicas inducido por la SP-A se ha llevado a cabo mediante dos tipos diferentes de aproximaciones experimentales:

#### *Variación discontinua de la temperatura.*

Se ha realizado en un espectrofotómetro Beckman DU-8 de acuerdo con las condiciones experimentales descritas previamente, realizando experimentos a distintas temperaturas (10, 20, 30, 40, 45, 50°C), inferiores y superiores a las temperaturas de transición de fase de las distintas vesículas utilizadas, DMPG, DPPC y DPPC/DPPG (7:3, en peso). Se controló la estabilidad térmica de la proteína a 45 o 50°C.

#### *Variación continua de la temperatura.*

Se ha realizado en un espectrofotómetro GBC 918 equipado con un accesorio peltier para la termostatación de las cubetas. Se utilizaron cubetas de 1 cm de paso óptico y se realizaron experimentos en presencia y ausencia de SP-A. La concentración de fosfolípidos y la relación lípido/proteína utilizada fue la misma que en los experimentos anteriores. El volumen total de la disolución fue de 1.2 ml. El ensayo se realizó

en ausencia de calcio milimolar. La temperatura se fue variando de manera continua con una velocidad de barrido de 0.5°C por minuto. Se realizaron experimentos calentando las muestras desde 20°C hasta 50°C y volviéndolas a enfriar y viceversa.

#### **3.9.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS PROTEINAS HIDROFOBICAS SP-B Y SP-C SOBRE LA ACITIVIDAD DE AGREGACION DE LIPIDOS DE LA SP-A**

##### *Reconstitución de SP-B y SP-C en vesículas de fosfolípidos.*

Típicamente, 35 µg de SP-B o SP-C disueltas en cloroformo/ metanol 2:1 (v/v) se adicionaron a 350 µg de vesículas de DPPC o DPPC/DPPG (7:3, en peso), disueltas en el mismo disolvente. Las muestras se sometieron a corriente de nitrógeno y posterior secado a vacío en un desecador toda la noche para eliminar el disolvente. Posteriormente se añadió tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4, hasta conseguir una concentración de 0.5 mg de fosfolípido/ml. Las muestras se hidrataron a 45°C durante 1 hora y se sonicaron a la misma temperatura mediante 3 pulsos de 120 watos y uno de 240 watos de 30 segundos con intervalos entre ellos de 15 segundos en un sonicador MSE Power Instruments. Para controlar la cantidad de proteína resuspendida, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos en una microfuga Beckman. Tras la centrifugación el contenido del tubo se trasvasó a otro tubo y el solvente se evaporó en una centrífuga UNIVAP. El contenido de cada tubo se analizó mediante electroforesis en presencia de SDS, tinción de plata y densitometrado. Por otra parte, la proteína remanente en el fondo de los tubos, que se sometió a centrifugación, se analizó de la misma manera. Los valores relativos se obtuvieron comparando cada banda de electroforesis con una muestra de proteína no sometida al tratamiento con lípidos que se corrió en cada gel. El resultado de este análisis puso de manifiesto que se requiere una relación proteína/lípido en peso mínima de 1:5 para la solubilización de dichas proteínas en lípidos.

##### *Ensayos de agregación lipídica.*

Se desarrollaron a 37°C de la siguiente manera: Las vesículas de fosfolípidos (30 µg), con o sin SP-B o SP-C, se añadieron a las cubetas de muestra y referencia en un volumen total de 300 µl de tampón Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl, pH 7.4. Después de 10 minutos a 37°C se añadieron 3 µg de SP-A a la cubeta de muestra y se midió



el cambio de absorbancia a 400 nm durante 10 minutos, con intervalos entre las sucesivas lecturas de absorbancia de 1 minuto. Posteriormente se añadió calcio (concentración final en el ensayo de 1 mM) en las cubetas de muestra y referencia, midiéndose el cambio en los valores de absorbancia a 400 nm durante 10 minutos. El EDTA se usó para prevenir (1 mM) o revertir (5 mM) la agregación de vesículas inducida por la SP-A.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

## **4.1. CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE LA SP-A**

### **4.1.1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS**

La SP-A es la proteína mayoritaria en peso en el surfactante pulmonar. Se la atribuyen funciones fundamentales para la organización estructural y el ciclo biológico del complejo lipoproteico. También parece estar implicada en la defensa alveolar frente a agentes patógenos. Se han realizado numerosos estudios con SP-A de diferentes especies de mamíferos (humana, canina, de rata, de conejo), así como con SP-A recombinante, obtenida tras clonar el gen de la SP-A humana y expresarla en un sistema celular "in vitro". Estas proteínas se han caracterizado con respecto a su composición de aminoácidos, migración electroforética, punto isoeléctrico y estructura secundaria (Benson et al., 1985; White et al., 1985; Sano et al., 1987 c; Boggaram et al., 1988; Haagsman et al., 1989). Sin embargo, no existen estudios semejantes realizados con SP-A de cerdo. Por tanto, un primer paso antes de abordar los estudios de interacción de la SP-A de cerdo con los fosfolípidos, fue caracterizar estructuralmente la SP-A de cerdo, comparando sus características con las SP-As de diferentes especies descritas en la literatura.

### **4.1.2. COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA SP-A**

En la tabla II aparece la composición de aminoácidos de la SP-A de cerdo, y de la SP-A humana, procedente de lavados broncoalveolares de pacientes de proteinosis alveolar. La composición de ambas es muy semejante, así como a la obtenida a partir de la secuencia genómica de la SP-A humana (White et al., 1985). La SP-A presenta un alto contenido en glicocola, atribuible al dominio colagénico de la SP-A, caracterizado por la repetición de la

Tabla II: COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA SP-A

AMINOACIDO	PORCINA	HUMANA	HUMANA *
Asx	18	20	20
Thr	9	11	11
Ser	11	11	11
Glx	26	25	26
Gly	32	34	36
Ala	15	15	12
Val	11	11	10
Met	4	n.d.	6
Ile	8	7	10
Leu	15	14	14
Tyr	7	7	8
Phe	7	7	6
His	5	6	5
Lys	9	8	7
Arg	12	13	13
Trp	2	2	2
Cys	7	7	7
Pro	n.d.	n.d.	25

\* Composición obtenida a a partir de la secuencia genómica humana (White et al., 1985).

secuencia Gly-X-Y. Nuestros resultados muestran que la SP-A de cerdo contiene sólo dos triptófanos, al igual que las procedentes de perro (Benson et al., 1985), rata (Sano et al., 1987 c), conejo (Boggaram et al., 1988) y humana (White et al., 1985). No se conoce la estructura primaria de la SP-A de cerdo, pero sí la de otras especies, obtenidas a partir de sus correspondientes secuencias genómicas. La posición de los triptófanos está conservada en todas las especies estudiadas. Los triptófanos se encuentran en el dominio C-terminal de la proteína. Existen 7 tirosinas en la SP-A de cerdo. De igual manera que los triptófanos, se encuentran en el dominio C-terminal. que la humana, tiene 7 cisteínas, a diferencia de la de rata (Sano et al 1987 c) y de perro (Benson et al., 1985). El número de aminoácidos ácidos es mayor que el de básicos, por lo que la SP-A tiene una carga neta negativa al pH fisiológico.

#### 4.1.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y en condiciones reductoras de la SP-A de cerdo (Figura 18) muestra una banda principal, muy ancha, entre 34 y 44 kDa y una banda menor centrada a 30 kDa al igual que la SP-A purificada de otras especies. La banda de 30 kDa corresponde a la proteína desglicosilada, ya que tras el tratamiento de la SP-A con N-endoglicosidasa F toda la proteína migra en la banda de menor masa molecular (Figura 18). El hecho de que la proteína glicosilada muestre una masa molecular entre 34 y 44 kDa se debe probablemente al distinto grado de glicosilación que presenta la SP-A.

Las muestras de SP-A humana que nos suministraron los profesores Haagsman y Van Golde habían sido caracterizadas previamente en Holanda en cuanto a su movilidad electroforética. Los resultados obtenidos son semejantes a los publicados por el mismo grupo (Haagsman et al., 1991) y por otros autores para la SP-A obtenida de pacientes de proteinosis alveolar (Voss et al., 1992).

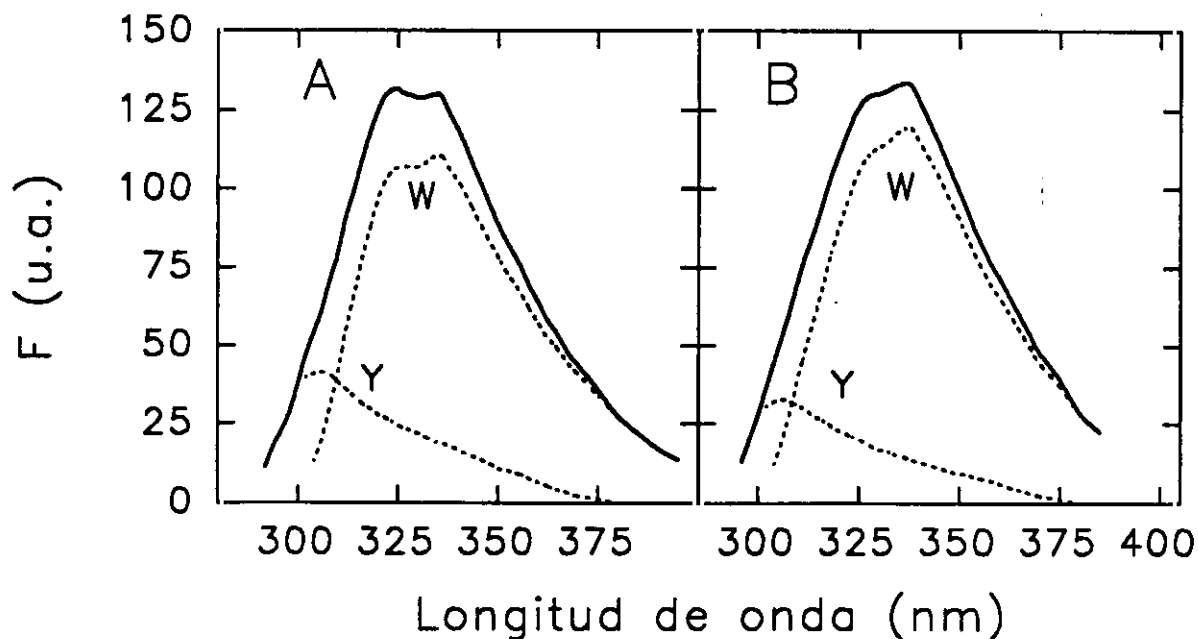


**FIGURA 18. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS de la SP-A de cerdo nativa (A) y desglicosilada mediante tratamiento con endoglicosidasa F (B).**

#### **4.1.4. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE LA SP-A**

En la Figura 19 se recogen los espectros de fluorescencia intrínseca de la SP-A de cerdo y humana obtenidos excitando a 275 nm. En estas condiciones, la emisión de fluorescencia de una proteína se debe a los residuos de triptófano y tirosina. Para analizar la contribución de los dos tipos de aminoácidos, se excitó la proteína a 295 nm, longitud de onda a la que la absorbancia de las tirosinas es inferior al 10% de la absorbancia que se produce excitando a 275 nm (Teale, 1960). Por tanto, la emisión que se observa excitando a 295 nm, corresponde principalmente a los residuos de triptófano de la SP-A. El espectro obtenido excitando a 295 nm, se normalizó respecto al registrado excitando a 275 nm, considerando que la emisión de fluorescencia a longitudes de onda superiores a 380 nm se debe exclusivamente a la emisión de los residuos de triptófano (Eisinger, 1969). El espectro normalizado, que aparece en la figura señalado como W, es el de la emisión de los residuos

de triptófano de la proteína. La diferencia entre el espectro registrado excitando a 275 nm y el espectro de emisión de los residuos de triptófano corresponde a la contribución de las tirosinas al espectro total de la SP-A, y aparece señalado en la figura como Y. El máximo de emisión de las tirosinas de la SP-A aparece a 305 nm.

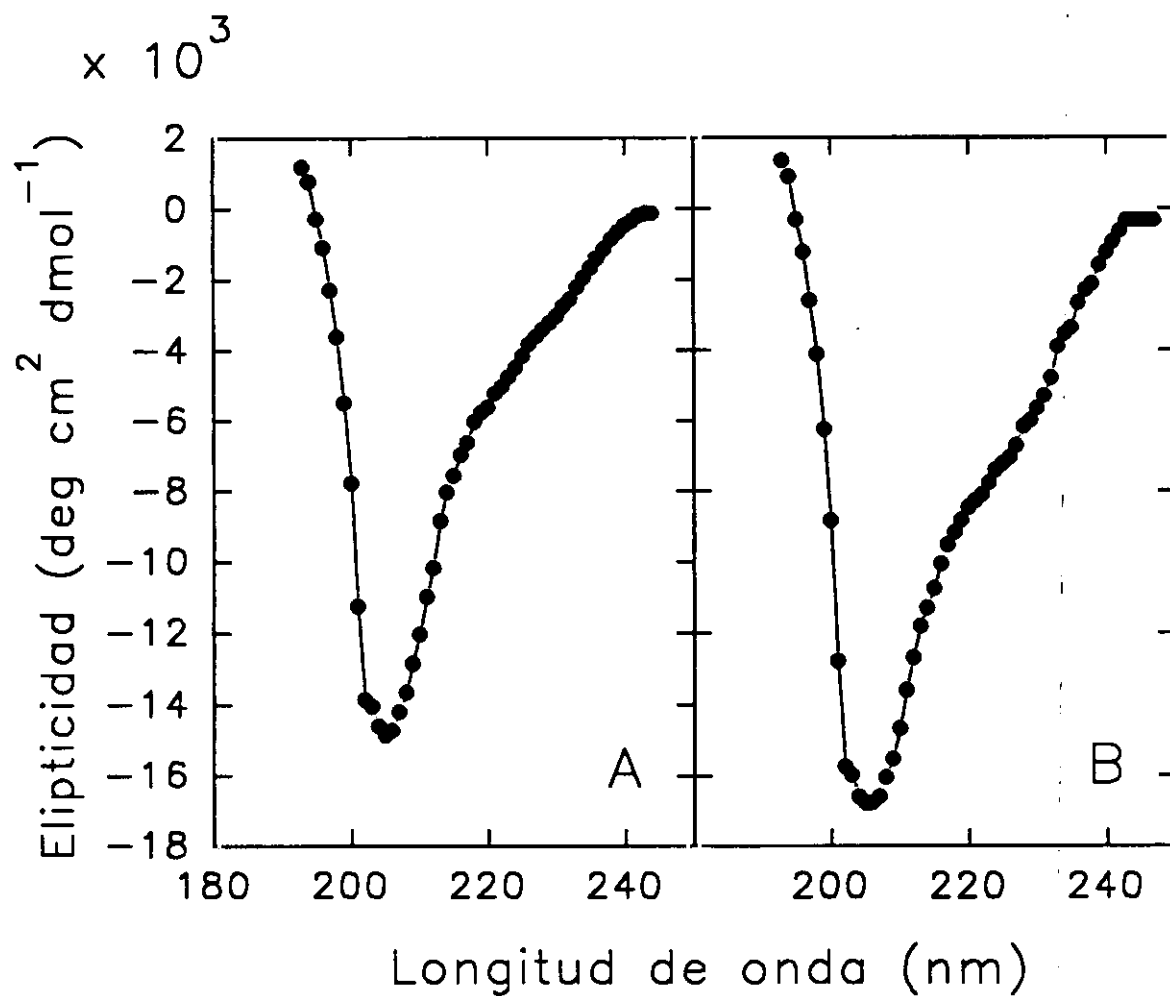


**FIGURA 19. Espectros de emisión de fluorescencia de la SP-A porcina (A) y humana (B).**

Las representaciones de trazo continuo son los espectros de fluorescencia total de la SP-A obtenidos al excitar a 275 nm. Las representaciones de trazo discontinuo son las contribuciones de los triptófanos (W) y las tirosinas de la SP-A (Y) al espectro total. La intensidad de emisión de fluorescencia (F) se expresa en unidades arbitrarias.

La fluorescencia de la SP-A se debe principalmente a los triptófanos. Presenta dos máximos a 326 y 337 nm, lo que indica heterogeneidad en la emisión de fluorescencia de estos fluoróforos. Los máximos de emisión a 326 y 337 nm se encuentran desplazados hacia el azul con respecto al del triptófano libre (350 nm), lo que indica que los residuos de triptófano de la SP-A se encuentran poco expuestos al solvente acuoso, estando parcialmente enterrados en la matriz proteica. Las dos poblaciones de triptófanos detectadas mediante espectroscopía de fluorescencia podrían corresponder a los dos residuos de triptófanos existentes en la proteína. Cuando la SP-A se desnaturaliza en cloruro de guanidinio 6M la emisión de fluorescencia de los residuos de triptófano decrece y la posición del máximo de

emisión se desplaza a 350 nm, indicando que, bajo estas condiciones, los residuos de triptófano se encuentran expuestos al solvente.



**FIGURA 20.** Espectros de dicroísmo circular de la SP-A porcina (A) y humana (B) a baja fuerza iónica.

#### 4.1.5. ESPECTROS DE DICROISMO CIRCULAR EN EL ULTRAVIOLETA LEJANO

La estructura secundaria de la SP-A en solución se ha estudiado mediante dicroísmo circular. En la Figura 20 aparecen los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano



de la SP-A de cerdo y humana. Ambos espectros se caracterizan por un extremo negativo a 205 nm y un hombro a 220 nm. Son semejantes en forma y magnitud a los espectros de dicroísmo circular publicados para la SP-A de perro, humana y recombinante (Voss et al., 1988; Haagsman et al., 1989). También son semejantes a los descritos para el factor de complemento C1q (Brodsky-Doyle et al., 1976), otra proteína colagénica que se ensambla de la misma manera que la SP-A.

#### 4.1.6. SUMARIO

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y en condiciones reductoras de la SP-A de cerdo muestra una banda principal entre 34 y 44 kDa y una banda menor, centrada a 30 kDa, que corresponden a la proteína glicosilada y desglucosilada, respectivamente.

La composición de aminoácidos de la SP-A de cerdo es similar a la descrita para SP-As de otras especies. Destaca el elevado contenido en glicocola, la presencia de dos residuos de triptófano, siete residuos de tirosina, siete cisteínas, y un mayor número de aminoácidos ácidos que básicos, por lo que la SP-A tiene carga neta negativa al pH fisiológico.

El espectro de fluorescencia intrínseca de la SP-A de cerdo y humana procedente de pacientes de proteinosis alveolar, muestra dos máximos de emisión, tanto excitando a 275 como a 295 nm, centrados a 326 y 337 nm, lo que indica heterogeneidad en la emisión de los dos triptófanos de la SP-A. La emisión de fluorescencia a esas longitudes de onda revela que los triptófanos de la SP-A se encuentran parcialmente enterrados en la matriz proteica.

El espectro de dicroísmo circular de la SP-A de cerdo y humana muestran un extremo de elipticidad negativa a 205 nm y un hombro a 220 nm. Es semejante en forma y magnitud al espectro obtenido para SP-A de otras especies y al del factor de complemento C1q.

## **4.2. EFECTO DEL MEDIO IONICO EN LA ESTRUCTURA DE LA SP-A**

### **4.2.1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS**

La SP-A es una proteína que une calcio (Haagsman et al., 1990). Muchas de sus propiedades son dependientes de la unión de calcio, como por ejemplo a) la unión de carbohidratos (Haagsman et al., 1987), b) la agregación de vesículas fosfolípídicas (Hawgood et al., 1985; Efrati et al., 1987; Haagsman et al., 1990), c) la formación "in vitro" de la mielina tubular, que depende de la presencia de SP-A, SP-B, fosfolípidos ácidos y calcio (Suzuki et al., 1989; Williams et al., 1991; Poulain et al., 1992), d) la adsorción de fosfolípidos a la interfase aire-líquido en presencia de las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C (King y McBeth, 1981; Hawgood et al., 1985) y e) la regulación de la secreción (Dobbs et al., 1987; Rice et al., 1987) o de la recaptura del surfactante desde el alveolo (Wright et al., 1987). Por otra parte, la SP-A purificada de lavados broncoalveolares humanos o caninos, en ausencia de lípidos, no se solubiliza en suero fisiológico (NaCl 0.15 M) a temperatura ambiente, pero se solubiliza fácilmente en tampones de baja fuerza iónica (Haagssman et al., 1987).

**El primer objetivo planteado en este apartado ha sido estudiar el efecto del calcio y de la fuerza iónica sobre la estructura de la SP-A de cerdo.** Para ello se han utilizado distintas técnicas experimentales: espectroscopía de fluorescencia y de absorción, dicroísmo circular y ensayos de susceptibilidad a la hidrólisis por tripsina.

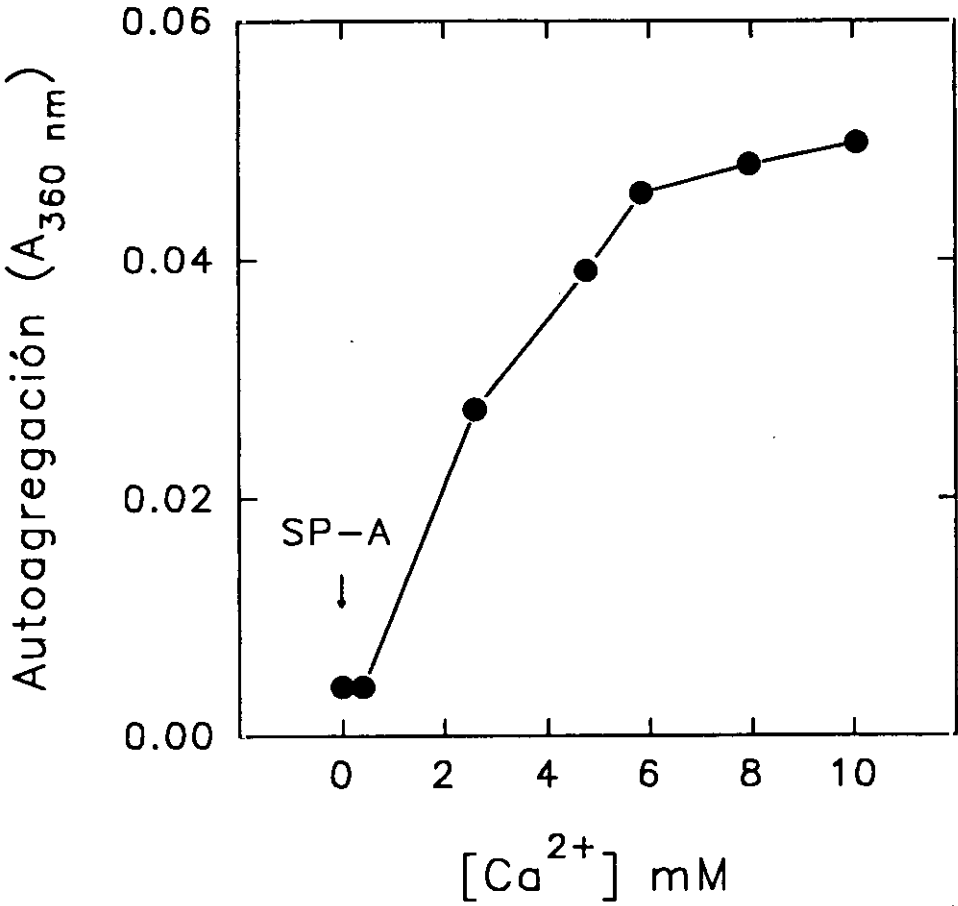
**El segundo objetivo planteado ha sido estudiar el efecto del pH ácido sobre la estructura de la SP-A, utilizando las mismas aproximaciones experimentales.** Si tenemos en cuenta que el surfactante pulmonar se almacena en los neumocitos tipo II, en vesículas de secreción especiales, denominadas cuerpos lamelares, que poseen un pH ácido, sería interesante conocer si en estas condiciones la proteína sufre algún cambio estructural.

#### 4.2.2. AUTOAGREGACION DE LA SP-A DEPENDIENTE DE CALCIO O DEL INCREMENTO DE LA FUERZA IONICA

Los primeros estudios realizados se han centrado en caracterizar el proceso de autoagregación de la proteína en presencia de calcio o NaCl, recientemente publicado por Haagsman et al. (1990). El primer aspecto abordado ha sido el estudio del requerimiento de calcio para el proceso de autoagregación de la SP-A de cerdo. En la Figura 21 se representa la autoagregación de la SP-A en función de la concentración de calcio, a baja fuerza iónica y pH neutro.

No existe autoagregación detectable por espectroscopía de absorción a concentraciones de calcio inferiores a 0.5 mM. La máxima autoagregación se produce en presencia de calcio 8 mM. La concentración de calcio a la que se produce la mitad de la autoagregación máxima de la SP-A es 2.5 mM. Este valor es ligeramente superior a la concentración de calcio en el alveolo (1.5 mM) (Nielson y Lewis, 1988). La concentración mínima de calcio para que se produzca la autoagregación de la SP-A de cerdo es igual al valor de concentración observado por Haagsman y colaboradores (1990) para la autoagregación de la SP-A de perro. La dependencia de calcio se pone de manifiesto por la disociación del agregado al añadir al medio EDTA (Figura 22).

La SP-A también autoagrega en presencia de NaCl 150 mM, sin que se requiera la adición de calcio (Figura 22). Es interesante constatar que, una vez que se forma el agregado de SP-A a fuerza iónica fisiológica, la adición de calcio 5 mM al medio no causa ningún cambio de absorbancia a 360 nm significativo, lo que indica que la extensión del agregado formado a fuerza iónica fisiológica no parece incrementarse tras la adición de calcio. Por el contrario, la SP-A a baja fuerza iónica no autoagrega, y tras la adición de calcio 5 mM se produce un incremento de absorbancia a 360 nm superior al generado por la autoagregación de la SP-A a fuerza iónica fisiológica. Por tanto, la extensión del agregado formado tras la adición de calcio es mayor que el generado a fuerza iónica fisiológica (Figura 22). Sorprendentemente, en ambos casos se produce la total disociación del agregado al añadir EDTA 1 mM al medio (Figura 22).



**FIGURA 21.** Autoagregación de la SP-A de cerdo en función de la concentración de calcio del medio.

Las alícuotas de CaCl<sub>2</sub> se añadieron cada 7 minutos. Se representa el último valor de absorbancia obtenido para cada concentración de calcio. La proteína (43 µg/ml) se encuentra en las cubetas de muestra y referencia en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 a la concentración de calcio indicada, y en ausencia de NaCl. Los experimentos se llevaron a cabo a 37°C.

Asimismo, se ha comprobado que la presencia de EDTA 1 mM en el medio de ensayo previene la autoagregación de la SP-A dependiente de la fuerza iónica (Figura 23). Se ha analizado, por tanto, la concentración de calcio existente en el agua Mili-Q, utilizada para la preparación de los tampones mediante espectroscopía de absorción atómica,

obteniéndose una concentración del orden de 5  $\mu$ M. Estos resultados indican que, para que se produzca la autoasociación de la SP-A dependiente de la fuerza iónica del medio se requiere calcio a concentraciones micromolares.

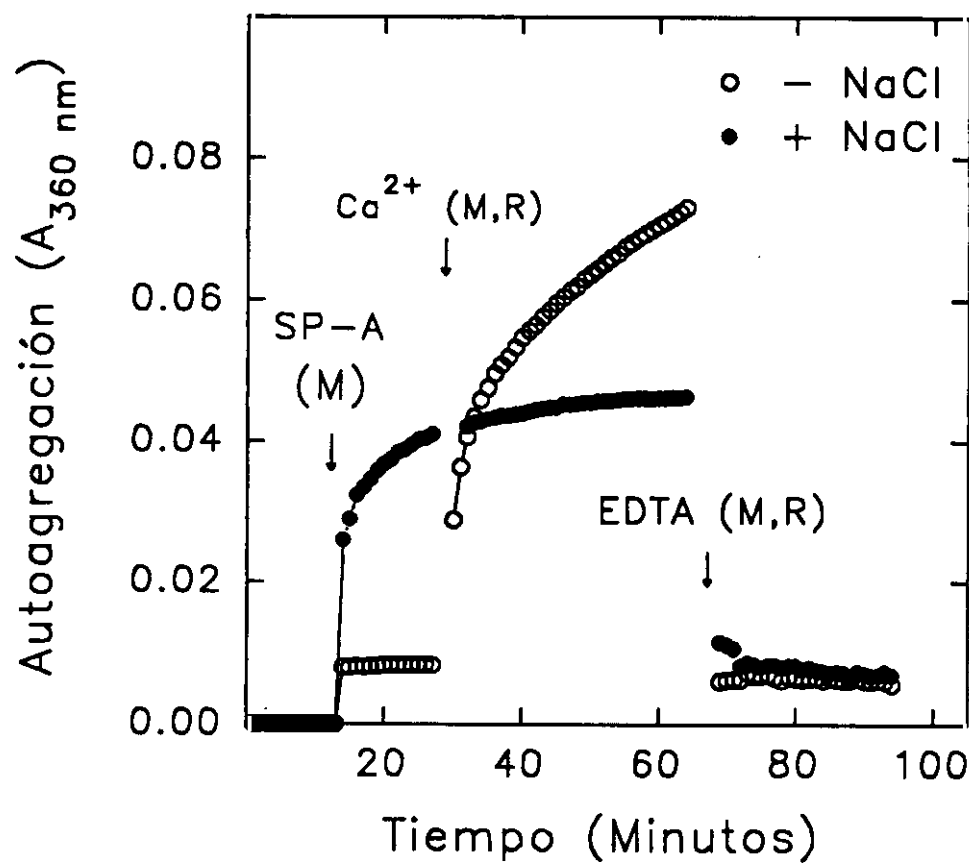
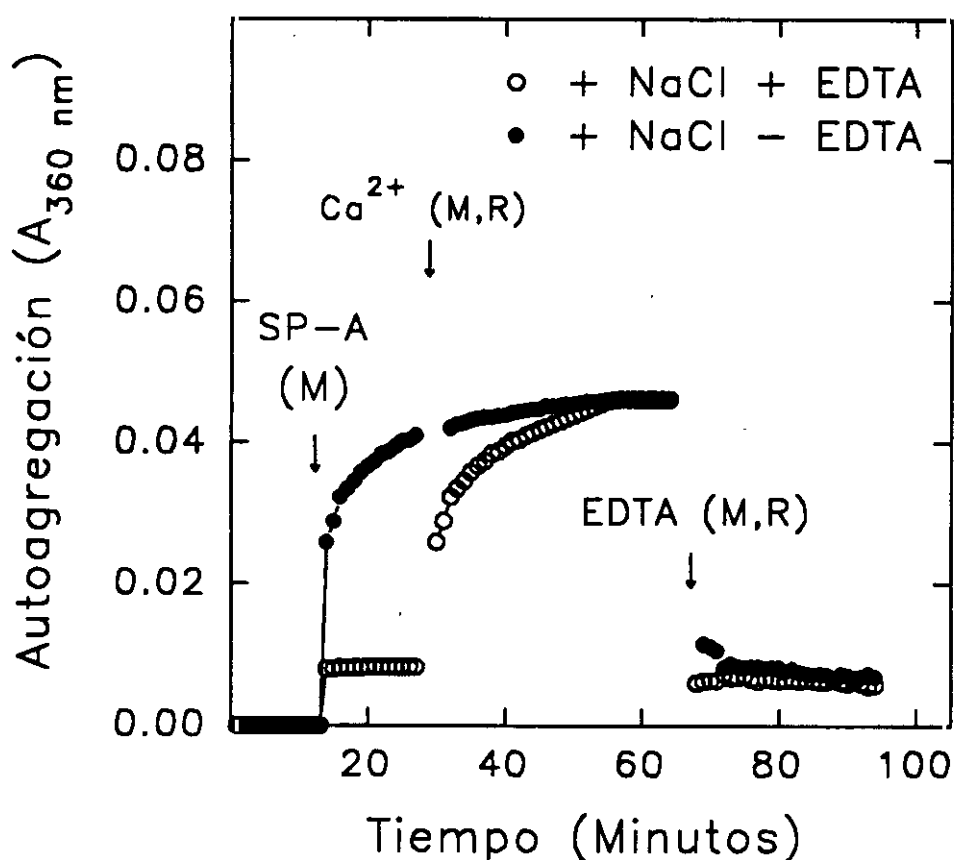


FIGURA 22. Efecto de la fuerza iónica en la autoagregación de la SP-A de cerdo.

Los experimentos se llevaron a cabo en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 en presencia o ausencia de NaCl 150 mM. (M) indica que el reactivo se añadió únicamente en la cubeta de muestra. (M,R) indica que se añadió en las cubetas de muestra y referencia. Las concentraciones de SP-A, calcio y EDTA fueron 50  $\mu$ g/ml, 5 mM y 16 mM, respectivamente. Los experimentos se llevaron a cabo a 37°C.



**FIGURA 23.** Efecto del calcio en concentraciones micromolares sobre la autoagregación de la SP-A inducida por la fuerza iónica.

Los experimentos se llevaron a cabo a  $37^{\circ}\text{C}$  en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 en presencia de EDTA 1mM. (M) indica que los reactivos se añadieron en cubeta de muestra; (M,R) indica que se añadieron en las cubetas de muestra y referencia. Las concentraciones de SP-A, calcio y EDTA, añadido para revertir el proceso, fueron  $50 \mu\text{g/ml}$ , 5 mM y 16 o 17 mM, respectivamente.

Haagsman et al. (1990) han estudiado la unión directa de  $^{45}\text{CaCl}_2$  a la SP-A mediante equilibrio de diálisis. Sus resultados se ajustan a un modelo basado en la existencia de dos tipos de sitios de unión: uno de alta afinidad, situado en el dominio de reconocimiento de carbohidratos, con una constante de disociación de  $11 \mu\text{M}^{-1}$  y otro, de baja afinidad, con una constante de disociación de  $0.7 \text{ mM}^{-1}$  localizado en el dominio colagénico, o al menos

dependiente de su presencia. Según estos resultados, podemos pensar que el calcio, a concentraciones micromolares se uniría al sitio de alta afinidad provocando un cambio conformacional que permitiría la autoasociación de la SP-A a fuerza iónica fisiológica en ausencia de lípidos. Es probable que la proteína asociada a lípidos tenga otro comportamiento.

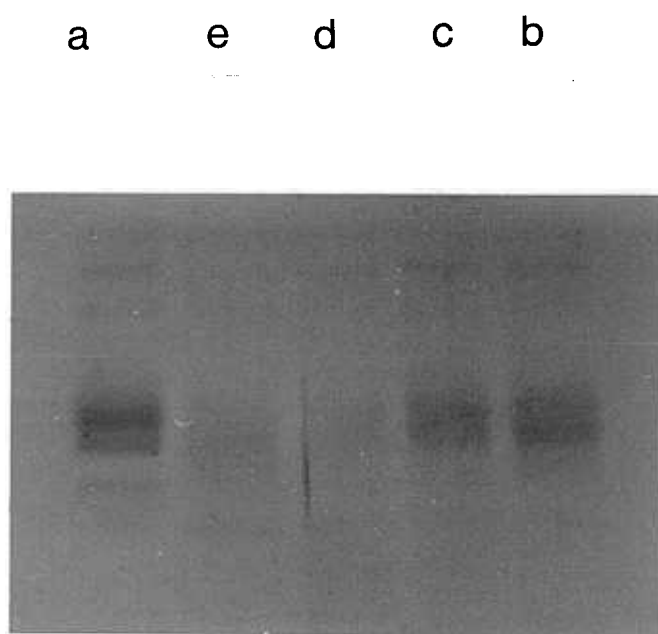
Teniendo en cuenta que la SP-A tiene un punto isoelectrico de 4.6-5.2, y que por tanto a pH neutro tiene carga negativa, el NaCl podría tener el efecto de neutralizar las cargas negativas superficiales de la proteína. De esta manera, se eliminaría la repulsión electrostática y se permitirían interacciones proteína-proteína que conducen a la autoagregación de la SP-A. Para que esto ocurra, es necesaria la presencia de calcio en el medio en concentraciones micromolares.

Por otra parte, el mecanismo por el cual el calcio a concentraciones milimolares y a baja fuerza iónica induce la autoasociación de la proteína podría ser distinto al descrito anteriormente a concentraciones de calcio micromolares y fuerza iónica fisiológica. La unión de calcio al sitio de baja afinidad podría generar cambios conformacionales que desencadenen la autoagregación de la proteína, aunque no puede descartarse que el calcio a concentraciones milimolares tenga un efecto semejante al NaCl (150 mM), neutralizando grupos carboxilo de la SP-A.

#### **4.2.3. SUSCEPTIBILIDAD A LA HIDROLISIS POR TRIPSINA DE LA FORMA AGREGADA Y NO AGREGADA DE LA SP-A DE CERDO**

En la Figura 24 se registra la extensión de la digestión triptica de la SP-A en su forma agregada (calles d y e) y no agregada (calles b y c). La SP-A en su forma agregada es mucho más susceptible a la hidrólisis por tripsina que en su forma no agregada. La SP-A se degrada casi completamente cuando agrega en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  5 mM a baja fuerza iónica (Figura 24 d). En contraste, la degradación del agregado de SP-A, generado a fuerza iónica fisiológica (y en presencia de concentraciones micromolares de calcio), es menos extensiva (Figura 24 e).

Estos resultados podrían apoyar la hipótesis de que el mecanismo molecular por el cual el  $\text{Ca}^{2+}$  (a concentraciones milimolares) o el incremento de la fuerza iónica del medio, inducen la autoagregación de la proteína, sea probablemente distinto. Al menos la estructura de la SP-A agregada por calcio debe ser distinta a la de la SP-A agregada por NaCl, ya que la susceptibilidad a la hidrólisis por tripsina de ambos tipos de estados de agregación de la proteína es distinta. Está claro que la autoagregación de la proteína inducida por calcio, a concentraciones milimolares, provoca un cambio en la estructura de la SP-A que permite que se expongan un mayor número de puntos diana susceptibles de ser hidrolizados por tripsina.



**FIGURA 24. Susceptibilidad a la hidrólisis por tripsina de la forma agregada de SP-A.**

calle a: Proteína control (5  $\mu\text{g}$ ) en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 (contiene  $\text{Ca}^{2+}$ ). Calle b: SP-A (5  $\mu\text{g}$ ) preincubada 30 minutos con el tampón anterior en presencia de EDTA 1 mM. Calle c: SP-A (5  $\mu\text{g}$ ) preincubada 30 minutos en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 (contiene  $\text{Ca}^{2+}$  5  $\mu\text{M}$ ). Calle d: SP-A (5  $\mu\text{g}$ ) preincubada 30 minutos en el mismo tampón en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  5 mM. Calle e: SP-A (5  $\mu\text{g}$ ) preincubada 30 minutos en el mismo tampón en presencia de NaCl 150 mM. Las muestras b-e se incubaron posteriormente con tripsina (750 ng) durante 6 horas a 37°C. Las incubaciones se detuvieron mediante adición de SDS. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y condiciones reductoras.



Los residuos susceptibles de ser atacados por la tripsina se encuentran, en la zona globular, en las posiciones 95, 117, 137, 159, 201, 216 y 222 en las especies en las que se conoce su estructura primaria (Sano et al., 1987 c). La región colagénica de la SP-A no sufre digestión triptica (King et al., 1989). Por tanto, los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que la autoasociación de la SP-A, tanto inducida por calcio (5 mM) como por NaCl (150 mM) no se produce por interacciones proteína-proteína que impliquen a la zona globular. De ser así, hubiese sido lógico encontrar una menor susceptibilidad a la hidrólisis por tripsina en su forma agregada.

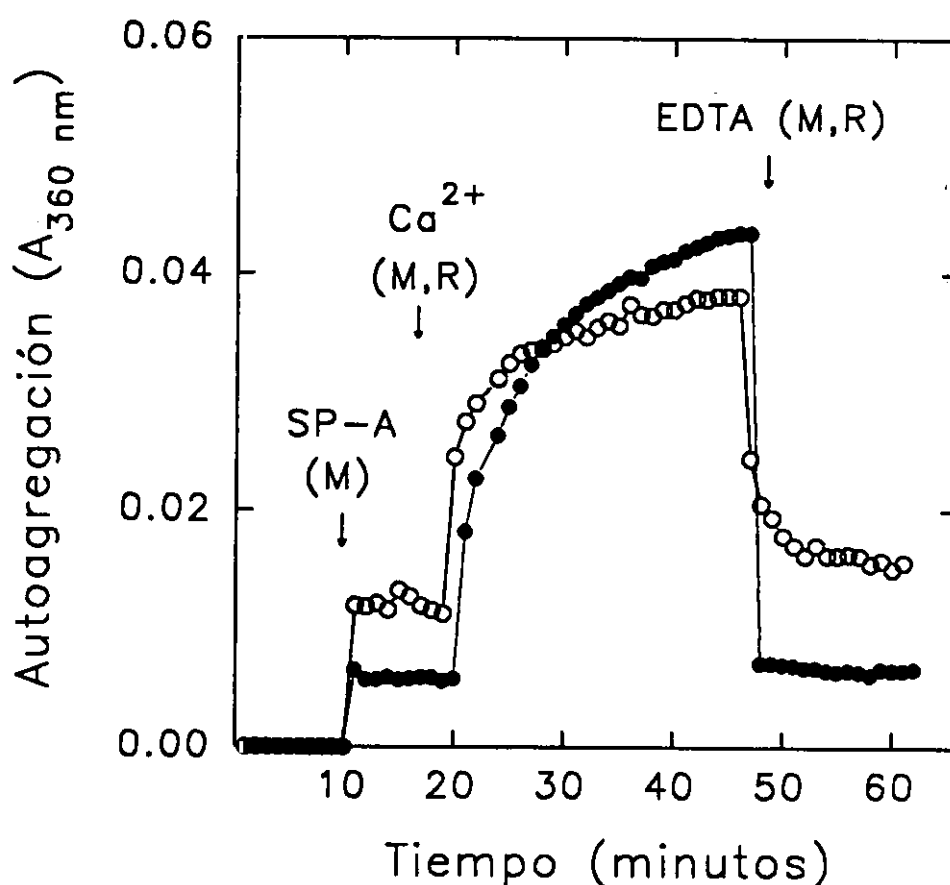
Las formas no agregadas de la SP-A (en presencia de EDTA, calle b, o en su ausencia y por tanto en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  5  $\mu\text{M}$ , calle c, muestran una mayor resistencia a la hidrólisis por tripsina. El efecto de la presencia de EDTA se discutirá en el apartado 4.2.5.

#### **4.2.4. REQUERIMIENTO DE LAS CADENAS OLIGOSACARIDAS DE LA SP-A PARA LA AUTOAGREGACION DE LA SP-A DEPENDIENTE DE CALCIO**

Haagsman et al. (1991) han sugerido que podrían existir dos mecanismos distintos de autoasociación de la SP-A dependiente de calcio: uno lateral, a través de las cadenas de colágeno, y otro radial, basado en la interacción entre las cadenas hidrocarbonadas de una molécula de SP-A y el dominio de reconocimiento de carbohidratos de otra molécula de SP-A. Para comprobar si las propiedades de tipo lectina de la SP-A están implicadas en la autoasociación de la proteína inducida por calcio, se han realizado estudios de autoagregación de la SP-A desglicosilada mediante tratamiento con endoglucosidasa F. La eficacia de la reacción de desglicosilación se ha seguido mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (Figura 18). El tratamiento de la SP-A con la enzima conduce a la desaparición de la banda de mayor masa molecular (34-44 kDa).

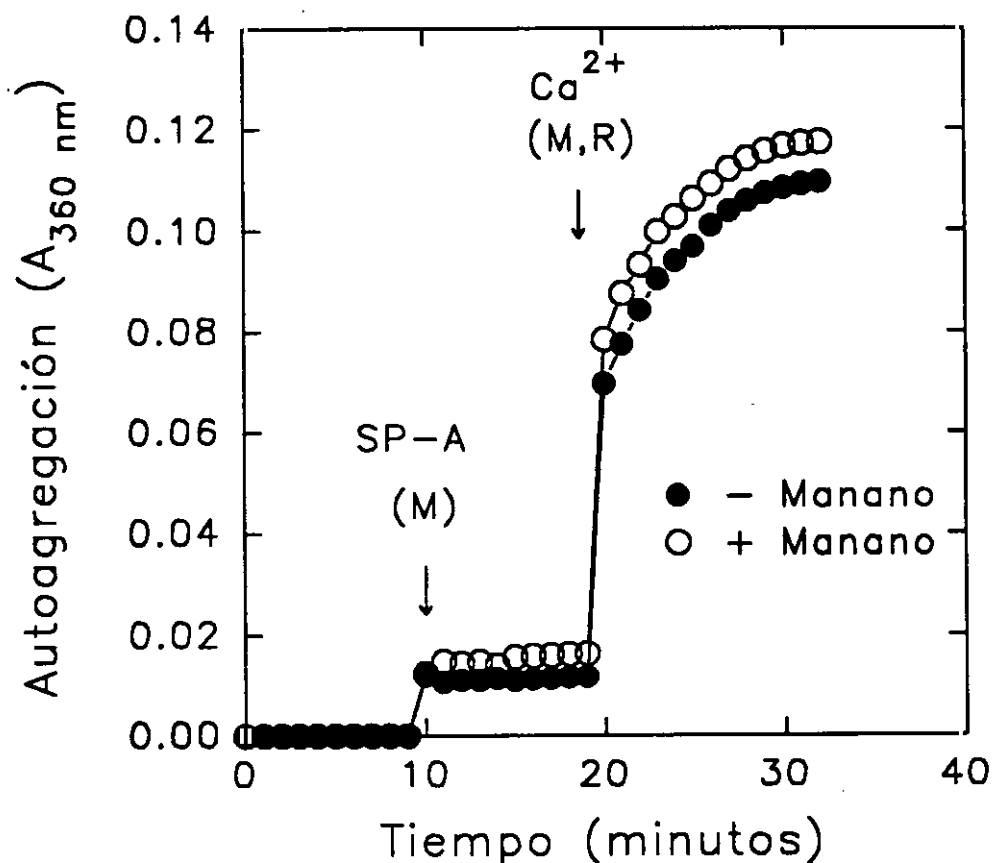
En la Figura 25 se registra la cinética de autoagregación de la SP-A desglicosilada y control. Se observa que, antes de la adición de calcio milimolar, se produce un mayor incremento de absorbancia tras la adición a la cubeta de muestra de SP-A desglicosilada que tras la adición de SP-A control. En presencia de calcio 5 mM no existe diferencia significativa en la extensión de la autoagregación de ambas proteínas. En ambos casos, el agregado se disocia por adición de EDTA 16 mM. Estos resultados indican que las interacciones de tipo

lectina no parecen estar implicadas en la autoagregación de la proteína, ya que la cinética de agregación es similar para la proteína control y desglicosilada. Esta conclusión está apoyada por los resultados obtenidos en experimentos en los que se ha añadido al medio de ensayo manano, un polímero de manosa que se une al sitio de unión de carbohidratos de la SP-A (Haagsman et al., 1991). En la Figura 26 se muestra la cinética de autoagregación de la SP-A en presencia y ausencia de manano. Tanto la cinética como la extensión de la agregación son idénticas en presencia y ausencia de manano.



**FIGURA 25.** Efecto de la desglicosilación sobre la autoagregación de la SP-A inducida por calcio milimolar.

Los experimentos se llevaron a cabo a 37°C en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4. (M) indica que los reactivos se añadieron en cubeta de muestra; (M,R) indica que se añadieron en las cubetas de muestra y referencia. Las concentraciones de SP-A, calcio y EDTA fueron 43 µg/ml, 5 mM y 16 mM, respectivamente. SP-A control (círculos llenos); SP-A desglicosilada (círculos vacíos).



**FIGURA 26.** Efecto del manano sobre la autoagregación de la SP-A inducida por calcio milimolar.

Los experimentos se llevaron a cabo a 37°C en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 en presencia o ausencia de manano 1% (P/V). (M) indica que los reactivos se añadieron en las cubetas de muestra; (M,R) indica que se añadieron en las cubetas de muestra y referencia. Las concentraciones de SP-A y calcio fueron 50  $\mu\text{g/ml}$  y 5 mM, respectivamente.

Nuestros resultados indican claramente que las interacciones de tipo lectina no parecen intervenir en la autoasociación de la SP-A dependiente de calcio. Si realmente existiera un mecanismo de autoagregación basado en la interacción entre las cadenas de azúcares de una molécula de SP-A y el sitio de unión de carbohidratos de otra molécula de

SP-A, sería esperable que la extensión de la autoagregación fuese menor para la SP-A desglucosilada, o para la SP-A nativa en presencia de manano. Existen otros argumentos que podrían apoyar la hipótesis de que la autoagregación de la SP-A, dependiente de calcio, se produce fundamentalmente a través de la interacción de los dominios colagénicos de la SP-A, y no a través del dominio globular: 1) El fragmento resistente a colagenasa no autoagrega en presencia de concentraciones de calcio de 25 mM (Haagsman et al., 1990). 2) La proteína autoagregada es mucho más susceptible a la hidrólisis por tripsina que la SP-A no autoagregada (Apartado 4.2.3., Figura 23). 3) Los resultados que aparecen en el apartado 4.2.6. de esta memoria muestran que se produce una reducción del extremo negativo a 205 nm del espectro de dicroísmo circular de la SP-A en presencia de calcio milimolar, que podría estar asociada a cambios en el dominio colagénico de la proteína.

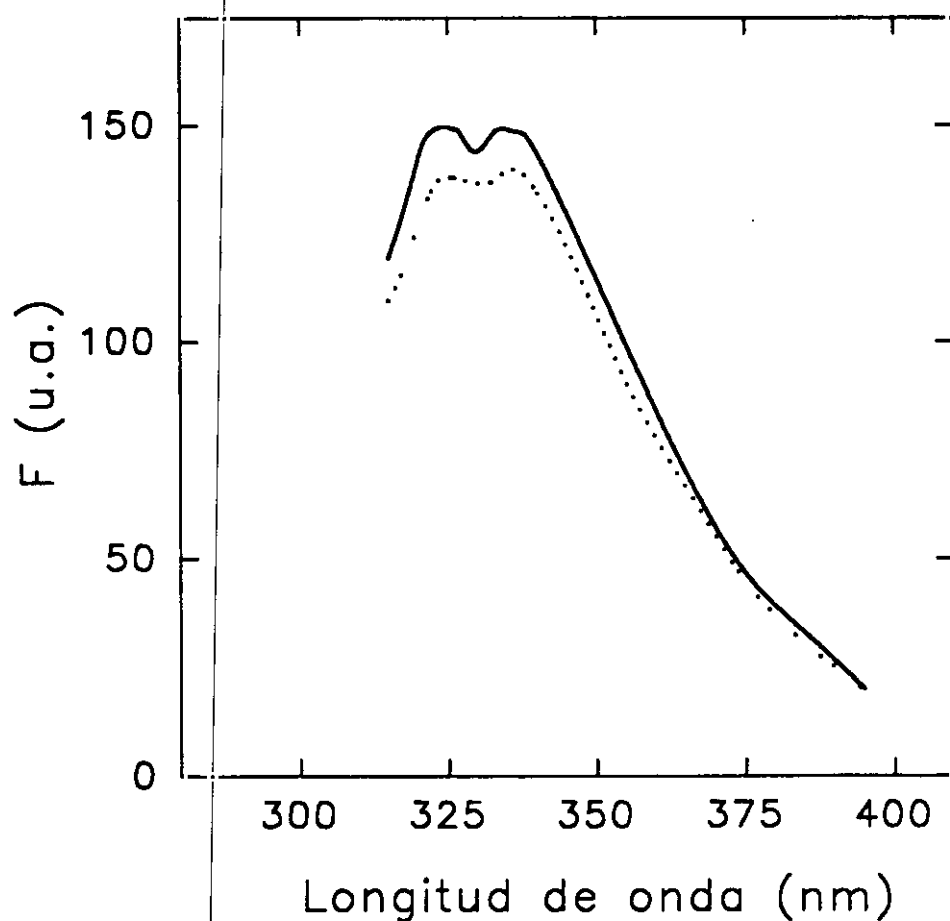
#### **4.2.5. CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LA SP-A INDUCIDOS POR CONCENTRACIONES MICROMOLARES DE CALCIO**

Para determinar si la unión de calcio a la SP-A induce cambios estructurales en la proteína se han realizado estudios de fluorescencia, dicroísmo circular y susceptibilidad a la hidrólisis por tripsina, en presencia y ausencia de EDTA 1 mM. En ausencia de EDTA, la concentración de calcio en los tampones es la que existe en el agua Mili-Q. Se ha determinado mediante espectroscopía de absorción atómica que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el agua Mili-Q es del orden de 5  $\mu\text{M}$ . A esta concentración de calcio la SP-A no sufre autoagregación.

##### Estudios de fluorescencia intrínseca

La Figura 27 muestra la comparación del espectro de fluorescencia de la SP-A ( $\lambda_{\text{exc}} = 295$ ) en presencia y ausencia de EDTA 1 mM. Se observa que, en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  micromolar se incrementa la intensidad de emisión de fluorescencia, y se desplaza la longitud de onda de los máximos de emisión hacia longitudes de onda inferiores. Estos resultados indican que, como resultado de la unión de calcio a la SP-A se produce un cambio conformacional a consecuencia del cual los residuos de triptófano se encuentran más protegidos de grupos polarizables, responsables del apagamiento de la fluorescencia de estos

fluoróforos. El desplazamiento de los máximos de emisión de 1-2 nm hacia el azul indicaría que los residuos de triptófano de la SP-A se encontrarían en un microentorno menos polar. Resultados semejantes se han obtenido para otras proteínas que unen calcio como la calpactina I (Gerke y Weber, 1985; Pigault et al., 1990)



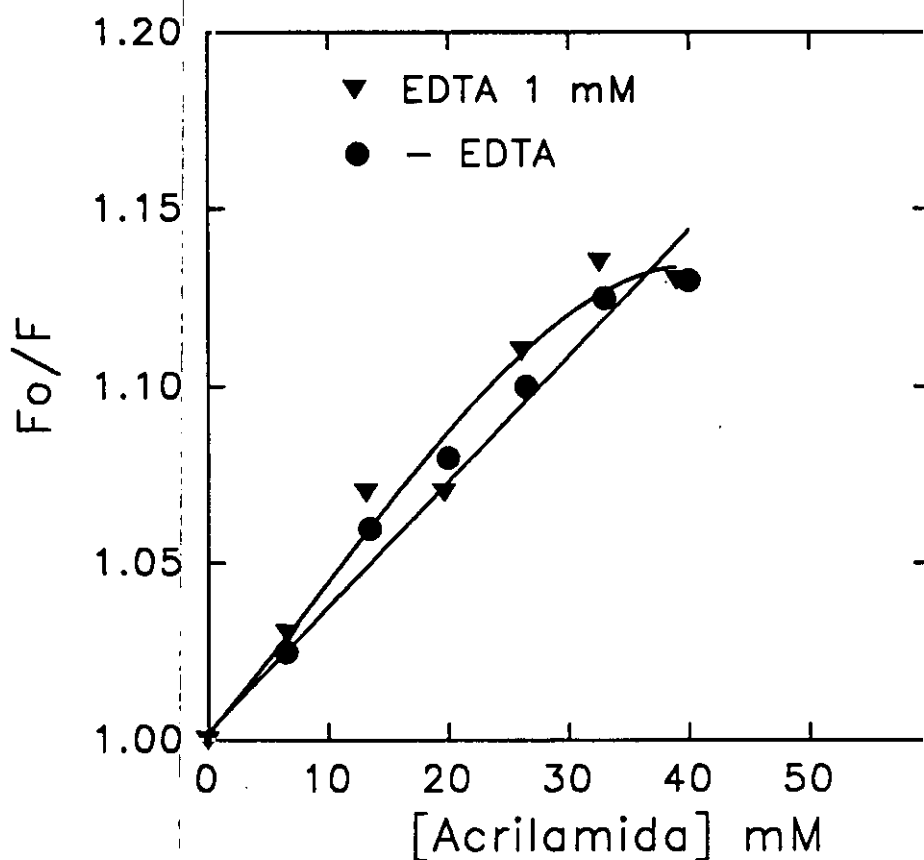
**FIGURA 26.** Espectros de emisión de fluorescencia de la SP-A de cerdo en presencia y ausencia de EDTA 1mM.

Los espectros se han registrado a 20°C utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm. La SP-A (10  $\mu\text{g/ml}$ ) se añadió en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, en presencia (línea de trazo discontinuo) o ausencia (línea de trazo continuo) de EDTA 1 mM.

El efecto del calcio en concentraciones micromolares sobre la estructura de la SP-A se ha estudiado también mediante la técnica de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la SP-A por acrilamida. La acrilamida es una molécula polar, no cargada. Se ha descrito en la literatura como un agente de "quenching" de derivados del grupo indol. En estudios con distintas proteínas, la acrilamida se ha mostrado capaz de apagar la fluorescencia de triptófanos localizados tanto en la superficie como en el interior de la proteína. La facilidad de un triptófano de ser apagado depende sólo de la frecuencia con la que se encuentre con una molécula de acrilamida (Eftink y Ghiron, 1976). La longitud de onda de excitación utilizada fue 295 nm, para excitar selectivamente los triptófanos y disminuir la absorbancia de la solución debida a la acrilamida ( $\epsilon^{280} = 4.3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\epsilon^{295} = 0.24 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (De Kroon et al., 1990).

La Figura 28 muestra la representación de Stern-Volmer del apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la SP-A por acrilamida en presencia y ausencia de EDTA 1 mM. En presencia de EDTA, los residuos de triptófano de la SP-A son más accesibles al agente de "quenching". La constante de "quenching" de la SP-A en ausencia de calcio ( $K_w = 4.45 \text{ M}^{-1}$ ) es, por tanto, mayor que cuando el calcio, a concentraciones micromolares, está presente en el medio ( $K_w = 2.35 \text{ M}^{-1}$ ). Estos resultados indican que el calcio, a concentraciones micromolares, induce un cambio conformacional en la SP-A que afecta al microentorno donde se encuentran los residuos de triptófano haciéndolos menos accesibles a la acrilamida.

Por otra parte, es interesante observar que se obtiene una representación de Stern-Volmer lineal en el intervalo de concentraciones de acrilamida entre 0 y 50 mM cuando la proteína se encuentra en presencia de calcio (5  $\mu\text{M}$ ). Por el contrario, en presencia de EDTA, se observa una desviación de la linealidad hacia abajo. En el caso de proteínas con más de un triptófano, como es el caso de la SP-A, representaciones de Stern-Volmer lineales indican que la accesibilidad de los fluoróforos al agente de "quenching" es similar. La desviación de la linealidad hacia abajo indicaría que los fluoróforos difieren en su accesibilidad al agente de "quenching" (Eftink y Ghiron, 1976; Somogyi y Lakos, 1993). La forma distinta de la representación de Stern-Volmer indica que la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a la proteína, en el sitio de alta afinidad, provoca un cambio conformacional en la SP-A que afecta a la región donde se encuentran los triptófanos.



**FIGURA 28.** Representación de Stern-Volmer del apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la SP-A de cerdo por acrilamida en presencia y ausencia de EDTA 1 mM.

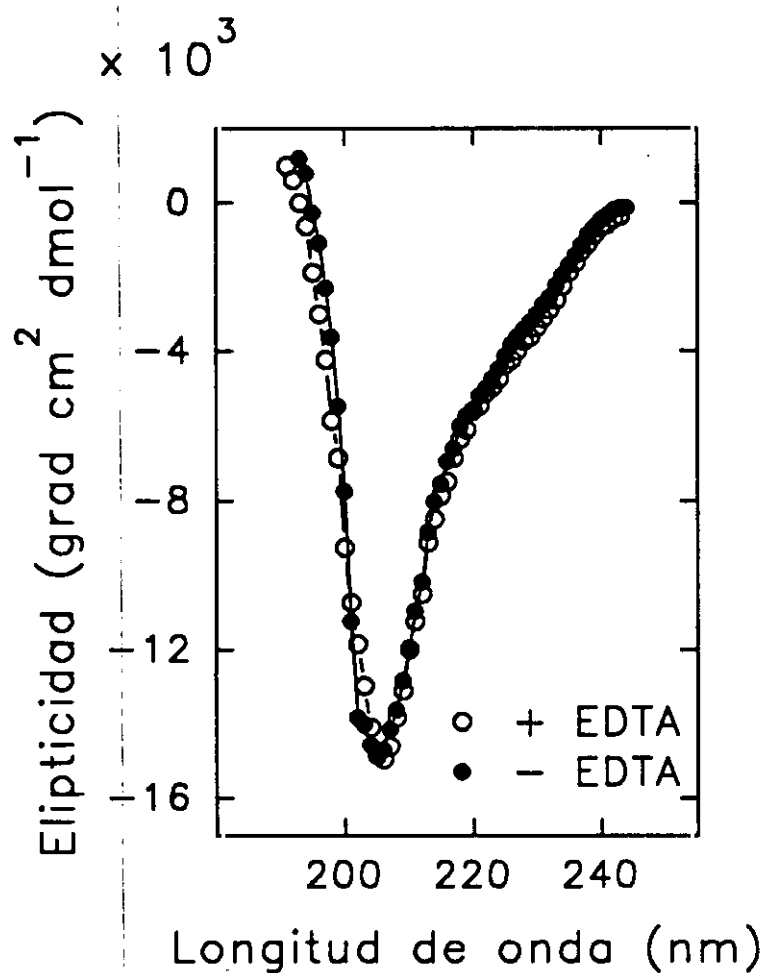
Los experimentos se realizaron a 20°C en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, en presencia o ausencia de EDTA 1 mM. La longitud de onda de excitación fue 295 nm. La concentración de SP-A utilizada fue 6.67 µg/ml. F<sub>0</sub> y F son las intensidades de emisión de fluorescencia a 330 nm en ausencia y presencia de acrilamida respectivamente.

#### Estudios de dicroísmo circular

En la Figura 29 se representa el espectro de dicroísmo circular de la SP-A en presencia y ausencia de EDTA 1 mM. No se observan variaciones significativas en el espectro

de dicroísmo circular de la SP-A de cerdo, tras la adición de EDTA al medio, en el rango de longitudes de onda estudiado.

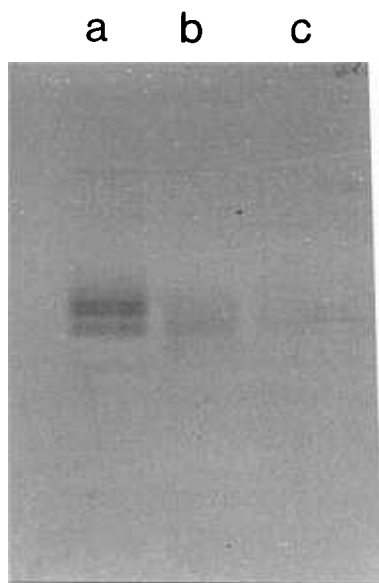
Mediante estudios de dicroísmo circular, no se puede concluir que se produzcan cambios en la estructura secundaria de la proteína como consecuencia de la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al sitio de alta afinidad.



**FIGURA 29.** Espectros de dicroísmo circular de la SP-A de cerdo en presencia de EDTA 1 mM.

La SP-A (0.1 mg/ml) se añadió en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, en presencia o ausencia de EDTA 1mM.





**FIGURA 30. Susceptibilidad a la hidrólisis por tripsina de la SP-A de cerdo en presencia y ausencia de EDTA.**

calle a: Proteína control (5  $\mu$ g) en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 (contiene  $\text{Ca}^{2+}$ ). Calle b: SP-A (5  $\mu$ g) preincubada 30 minutos con el tampón anterior en presencia de EDTA 1 mM. Calle c: SP-A (5  $\mu$ g) preincubada 30 minutos en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 (contiene  $\text{Ca}^{2+}$  5  $\mu$ M). Las muestras b y c se incubaron posteriormente con tripsina (750 ng) durante 6 horas a 37°C. La reacción se detuvo por adición de SDS. Las muestras se sometieron posteriormente a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y condiciones reductoras.

#### Susceptibilidad a la hidrólisis por tripsina

En la Figura 30 se observa el resultado de la hidrólisis trípica de la SP-A en presencia y ausencia de EDTA. Cuando la SP-A se encuentra en presencia de EDTA 1 mM (calle b) es más resistente a la hidrólisis que cuando el EDTA está ausente, y por tanto en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  5  $\mu$ M (calle c). Estos resultados indican que la unión de calcio a la SP-A en el sitio de alta afinidad provoca un cambio conformacional que causa la exposición de enlaces peptídicos susceptibles de hidrólisis por tripsina. En ausencia de calcio, la SP-A adquiere una estructura más resistente a la digestión trípica. Es interesante el hecho de que, tanto en

presencia como en ausencia de EDTA, la proteína desglicosilada se hidroliza totalmente por tripsina.

#### **4.2.6. CAMBIOS ESTRUCTURALES PRODUCIDOS EN LA SP-A COMO CONSECUENCIA DE LA AUTOAGREGACION DE LA PROTEINA**

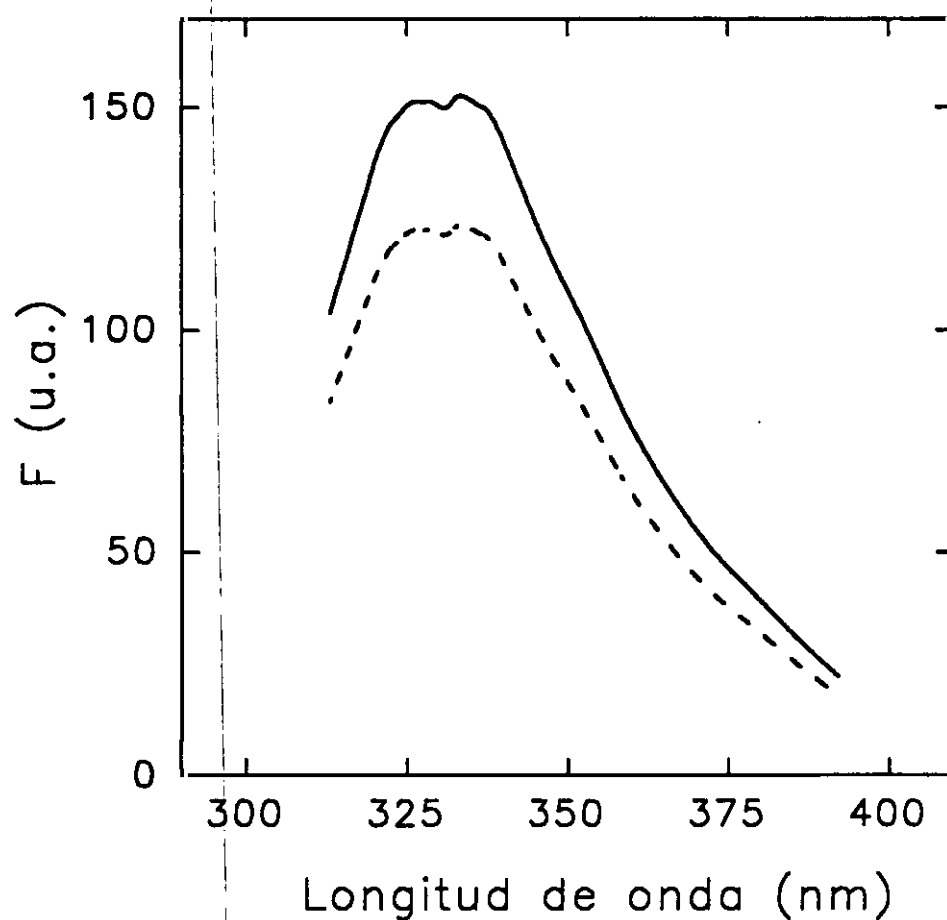
##### **4.2.6.1. Efecto de concentraciones milimolares de calcio**

La Figura 31 muestra los espectros de emisión de fluorescencia de la SP-A ( $\lambda_{exc}$  295 nm) en presencia y ausencia de  $Ca^{2+}$  5mM. En presencia de calcio 5 mM se produce una disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A, lo que indica que los residuos de triptófano de la SP-A en su forma agregada se encuentran menos protegidos de grupos polarizables de la propia proteína (-SH, -NH<sub>2</sub> y -S-S-) o del solvente, responsables del apagamiento de la fluorescencia del triptófano. La longitud de onda de los máximos de emisión no varía, lo que indica que no se producen cambios en la polaridad del entorno en el que se encuentran los residuos de triptófano de la SP-A en su forma agregada.

En la Figura 32 se registra la variación de la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A en función de la concentración de  $Ca^{2+}$ , en presencia y ausencia de NaCl 150 mM.

La intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A en ausencia de NaCl comienza a disminuir a concentraciones de calcio superiores a 0.5 mM, estabilizándose a concentraciones superiores a 5 mM. La disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A en función de la concentración de calcio sigue un patrón similar al aumento del estado de agregación de la SP-A dependiente de la concentración de calcio en medios de baja fuerza iónica (Apartado 4.2.2. Figura 22). Estos resultados indican que, al producirse el agregado cambia la conformación de la SP-A, y ese cambio afecta al microentorno donde se encuentran los triptófanos.

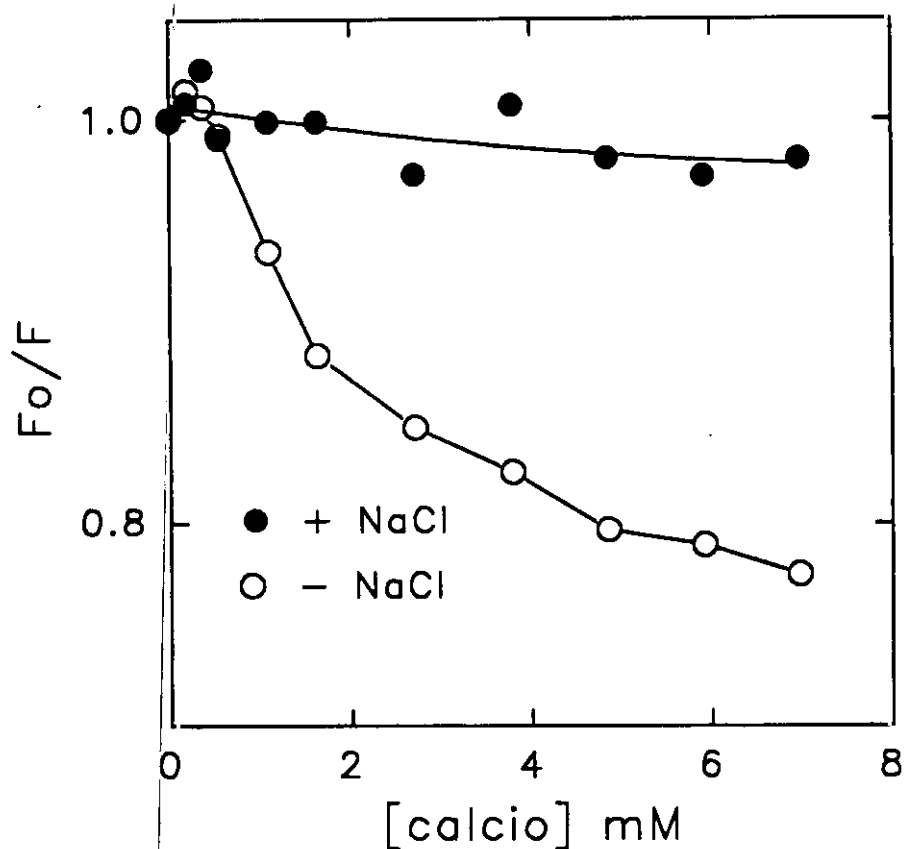
En la Figura 31 también se observa que cuando la SP-A se encuentra en presencia de NaCl 150 mM, la adición de calcio no afecta a la intensidad de emisión de fluorescencia de la proteína en el rango de concentraciones estudiado. La SP-A autoagrega en medios que



**FIGURA 31.** Espectros de emisión de fluorescencia de la SP-A en presencia de calcio 5 mM.

Los experimentos se llevaron a cabo a 20°C en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 en presencia (línea de trazo discontinuo) o ausencia (línea de trazo continuo) de  $\text{CaCl}_2$  5 mM. La concentración de SP-A fue 10  $\mu\text{g/ml}$ . La longitud de onda de excitación fue 295 nm.

contienen NaCl 150 mM (Apartado 4.2.2. figura 21). La adición posterior de calcio 5 mM no produce una agregación adicional, manteniéndose invariable el valor de absorbancia a 360 nm generado por la autoagregación de la SP-A en presencia de NaCl. Los experimentos de fluorescencia demuestran que la adición de calcio a agregados de SP-A generados a fuerza

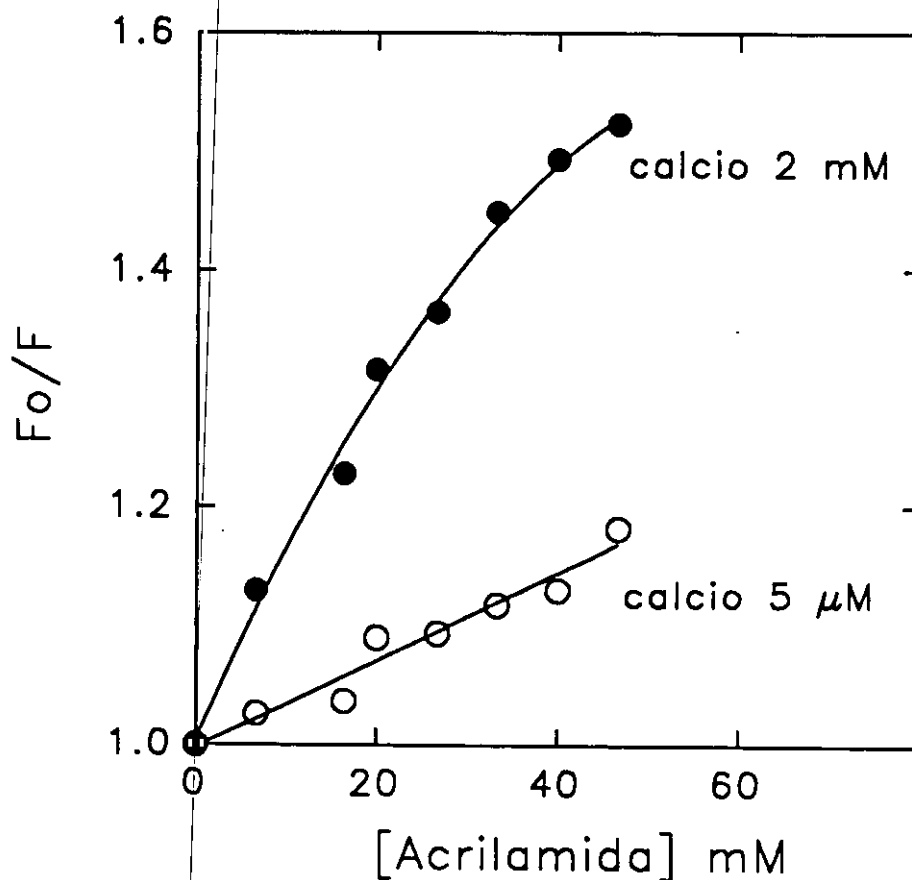


**FIGURA 32. Variación de la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A de cerdo en función de la concentración de calcio del medio.**

Los experimentos se llevaron a cabo a 20°C. La SP-A (10  $\mu\text{g/ml}$ ) se añadió en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, en presencia o ausencia de NaCl 150 mM. El intervalo entre adiciones sucesivas de  $\text{CaCl}_2$  fue 3 minutos.  $F_0$  y  $F$  son las intensidades de emisión de fluorescencia a 330 nm de SP-A en ausencia y presencia de calcio, respectivamente. La longitud de onda de excitación utilizada fue 275 nm.

iónica fisiológica no produce ninguna variación en la estructura de la SP-A. Por tanto, el calcio, a concentraciones milimolares, induce la agregación de la SP-A a baja fuerza iónica, pero no afecta a los agregados de SP-A formados en presencia de NaCl. Los dos tipos de agregados de la SP-A (generado por  $\text{Ca}^{2+}$  a baja fuerza iónica, o generado a fuerza iónica fisiológica en presencia de concentraciones micromolares de calcio), parecen tener

características estructurales distintas como lo demuestra el hecho de que presenten distinta susceptibilidad a hidrólisis por tripsina (Apartado 4.2.3. Figura 24).



**FIGURA 33.** Representación de Stern-Volmer del apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la SP-A por acrilamida en presencia de calcio 2 mM.

Los experimentos se realizaron a 20°C en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, en presencia o ausencia de  $\text{CaCl}_2$  2 mM. La longitud de onda de excitación fue 295 nm. La concentración de SP-A utilizada fue 6.67  $\mu\text{g/ml}$ .  $F_o$  y  $F$  son las intensidades de emisión de fluorescencia a 330 nm en ausencia y presencia de acrilamida respectivamente.

Otra aproximación experimental para estudiar el cambio estructural de la SP-A originado como consecuencia de la autoagregación de la proteína dependiente de calcio, es el estudio del apagamiento por acrilamida de la fluorescencia de la SP-A agregada (en

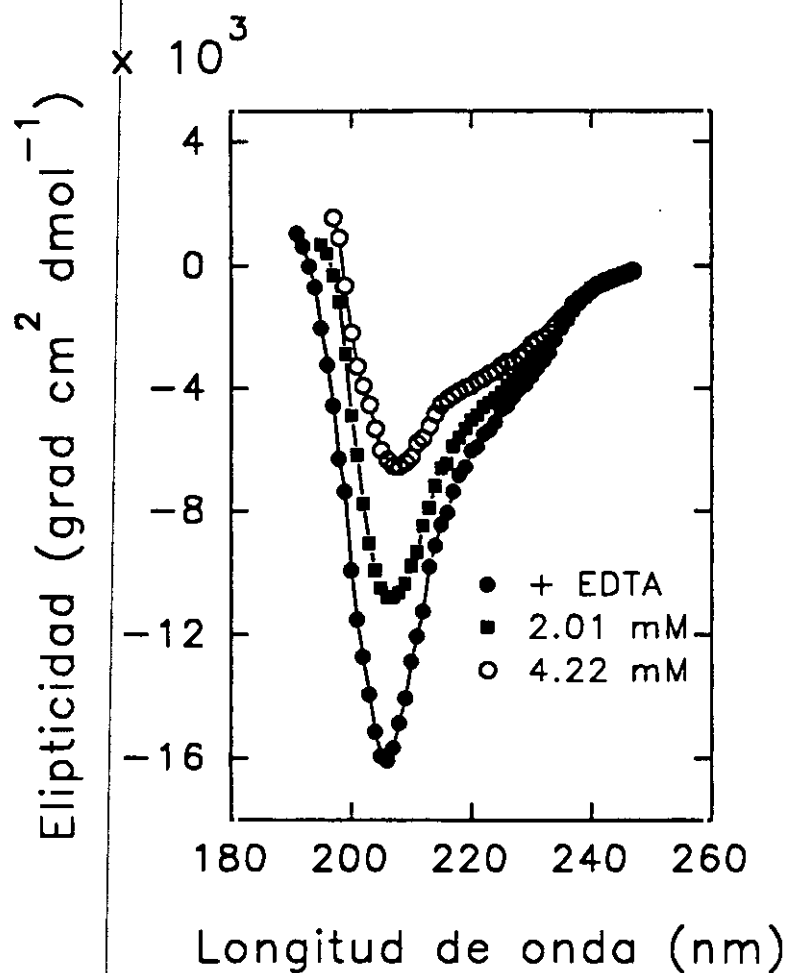
presencia de calcio 2 mM) y no agregada (en presencia de calcio 5  $\mu$ M). Los resultados de estos experimentos aparecen en la Figura 33. En presencia de calcio milimolar se incrementa la fracción de fluorescencia de la SP-A susceptible de ser apagada por la acrilamida. Además la desviación de la linealidad de la representación de Stern-Volmer del apagamiento de la fluorescencia de la SP-A agregada, por acrilamida indica que las dos poblaciones de triptófano de la proteína tienen una accesibilidad por acrilamida diferente. La SP-A en su forma no agregada, en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  5  $\mu$ M, presenta una constante de "quenching" ( $K_w = 2.35 \text{ M}^{-1}$ ) menor que la forma agregada ( $K_w = 16.21 \text{ M}^{-1}$ ). Además, la accesibilidad de las dos poblaciones de triptófano por acrilamida es parecida. Estos resultados ponen de manifiesto que como consecuencia de la agregación inducida por concentraciones milimolares de calcio se producen variaciones en la estructura de la SP-A.

Por otra parte, se han registrado los espectros de dicroísmo circular de la SP-A en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de calcio (Figura 34). Los espectros son cualitativa y cuantitativamente diferentes. Se observa una reducción del valor de elipticidad negativa y una alteración de la forma del espectro. La pérdida de elipticidad es mayor a 205 que a 222 nm, por lo que la relación de elipticidades a 205 y 222 nm disminuye a medida que se incrementa la concentración de calcio en el medio (Figura 35). El proceso se satura en presencia de calcio 5 mM. La reducción de la elipticidad negativa observada no se debe a una disminución de la concentración de proteína en solución después de la adición de  $\text{CaCl}_2$ , ya que la concentración de proteína determinada mediante análisis de aminoácidos, antes y después de la adición de calcio fue idéntica.

Podría pensarse que, debido a que la SP-A autoagrega en presencia de calcio 5 mM, la dispersión de la muestra provocase una disminución de la elipticidad negativa artefactual, especialmente a 205 nm. Sin embargo, cuando se lleva a cabo el espectro de dicroísmo circular de la SP-A en presencia de vesículas de DPPC/DPPG sin adicionar calcio al medio, se observa un cambio menor en los valores de elipticidad negativa a esa longitud de onda que en ausencia de lípidos y presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  5 mM. La dispersión provocada por las vesículas es, sin embargo, mucho mayor que la provocada por la autoagregación de la proteína dependiente de calcio.

La disminución de los valores de elipticidad negativa a 205 nm en función de la concentración de calcio podría sugerir que se producen cambios en la estructura secundaria

de la SP-A que podrían estar asociados con cambios en el dominio colagénico de la proteína, ya que la desnaturalización térmica de la triple hélice de colágeno o la digestión de la SP-A con collagenasa bacteriana producen una disminución de la elipticidad negativa a 205 nm (Voss et al., 1988; Haagsman et al., 1989; King et al., 1989)



**FIGURA 34. Espectros de dicroísmo circular de la SP-A en presencia de concentraciones crecientes de calcio.**

La SP-A (0.1 mg/ml) se añadió en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4. A continuación se añadieron alícuotas de una solución 0.075 M de  $\text{CaCl}_2$ . Las concentraciones finales de calcio se indican en la figura.

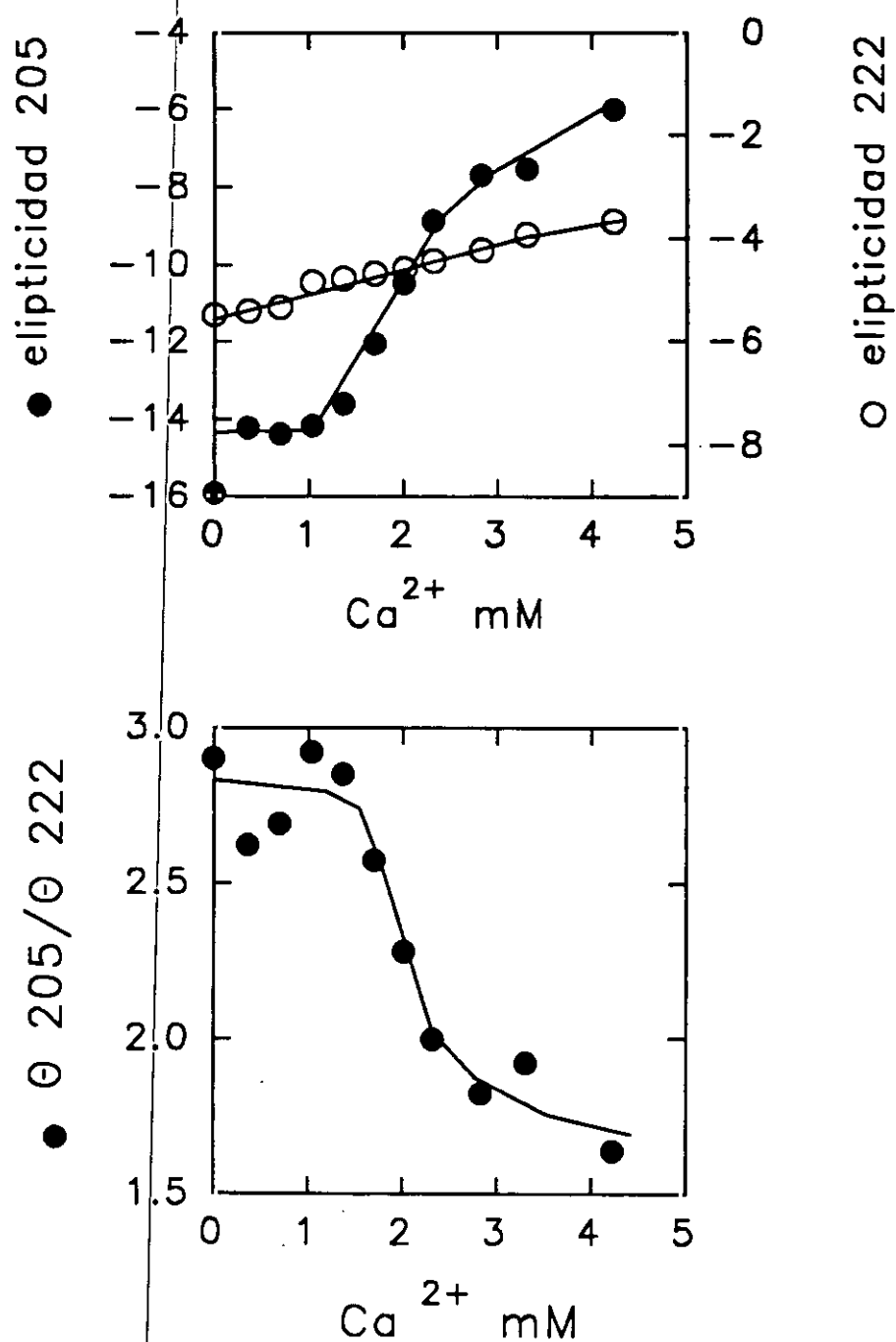


FIGURA 35. Variación de los valores de elipticidad a 205 y 22 nm, y de la relación  $\theta_{205}/\theta_{222}$  en función de la concentración de calcio.



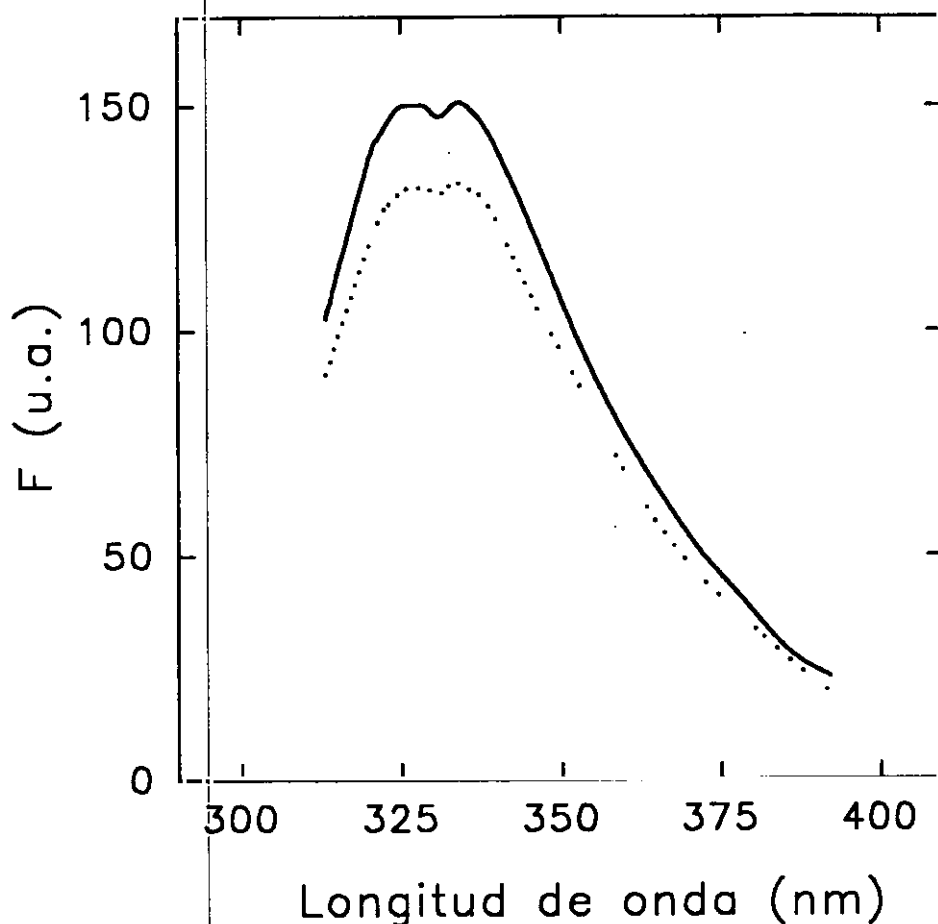
#### 4.2.6.2. Efecto de la fuerza iónica

La Figura 36 muestra los espectros de emisión de fluorescencia de la SP-A de cerdo en presencia y ausencia de NaCl 150 mM. Se observa que la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A disminuye en presencia de NaCl 150 mM, sin que se aprecien cambios en la longitud de onda de los máximos de emisión. Estos resultados indican que, aunque la polaridad del medio donde se encuentran los residuos de triptófano de la SP-A es semejante en presencia y ausencia de NaCl, al aumentar la fuerza iónica se produce un apagamiento de la fluorescencia de los residuos de triptófano de la SP-A, probablemente, al por estar menos protegidos de grupos polarizables de la propia proteína, lo que indica un cambio conformacional en la SP-A.

En la Figura 37 se presenta la variación de la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A, en función de la concentración de NaCl del medio, en presencia y ausencia de EDTA. La intensidad de emisión de fluorescencia comienza a disminuir a concentraciones de NaCl superiores a 50 mM, siempre y cuando exista calcio en el medio a concentraciones micromolares (5  $\mu$ M). En presencia de EDTA, no se producen cambios en la emisión de fluorescencia de la SP-A en todo el rango de concentraciones de NaCl estudiadas.

La disminución de la intensidad de fluorescencia observada al incrementarse la fuerza iónica del medio se produce como consecuencia de un cambio estructural originado por la autoagregación de la SP-A en estas condiciones (Apartado 4.2.2. Figura 22), que probablemente causa un acercamiento de grupos polarizables de la proteína a las proximidades de los residuos de triptófano. Esto provoca un aumento del "quenching" estático ocasionado por estos grupos, y por tanto, una disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia. Otras proteínas con carga neta al pH fisiológico, como es el caso de la proteína básica de mielina, agregan en presencia de fuerza iónica. Como consecuencia de la autoagregación se incrementa la emisión de fluorescencia emitida por la proteína (Novak y Berman, 1991). Los autores interpretan los resultados como consecuencia del alejamiento de residuos cargados positivamente de las proximidades de un residuo de triptófano, lo que conlleva la disminución del "quenching" estático ocasionado por estos grupos polarizables. La adición de EDTA al medio previene la autoagregación de la SP-A a fuerza iónica fisiológica, al igual

que previene la disminución de intensidad de emisión de fluorescencia al incrementarse la fuerza iónica del medio.

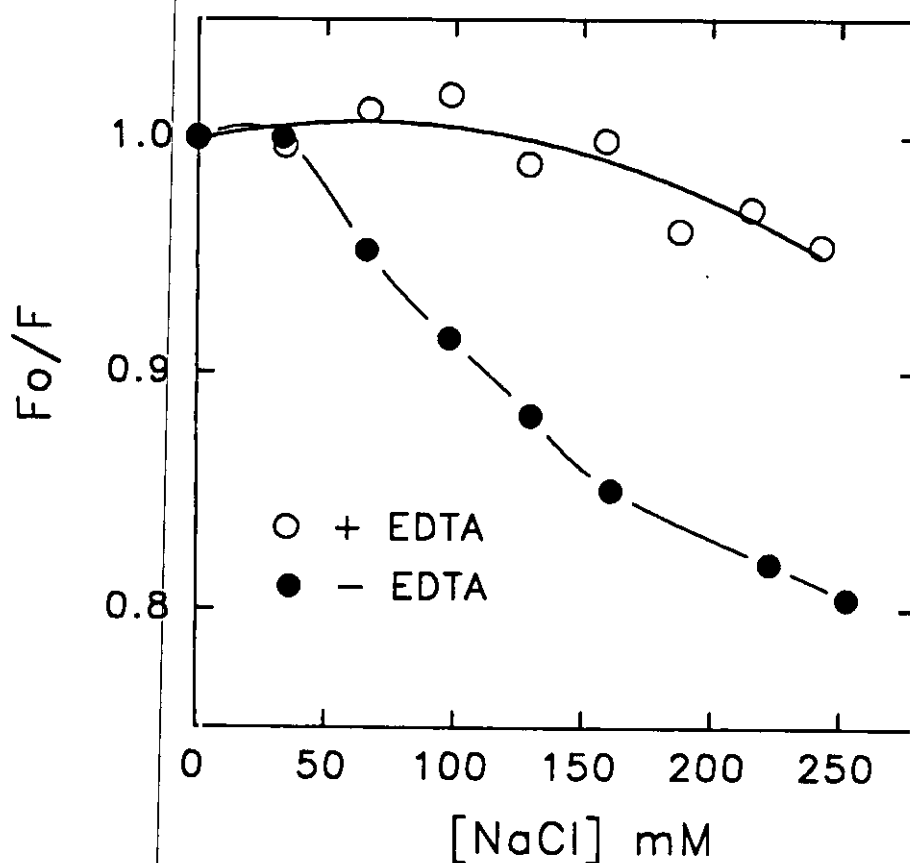


**FIGURA 36.** Espectros de emisión de fluorescencia de la SP-A en presencia de NaCl 150 mM.

Los experimentos se llevaron a cabo a 20°C en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 en presencia (línea de trazo discontinuo) o ausencia (línea de trazo continuo) de NaCl 150 mM. La concentración de SP-A fue 10  $\mu\text{g/ml}$ . La longitud de onda de excitación fue 295 nm.

La Figura 38 recoge el estudio del apagamiento de la fluorescencia por acrilamida de la SP-A agregada (en presencia de NaCl 150 mM) y no agregada (en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  5  $\mu\text{M}$ ). Se observa que a fuerza iónica fisiológica, la constante de "quenching" ( $K_w = 10.3 \text{ M}^{-1}$ )

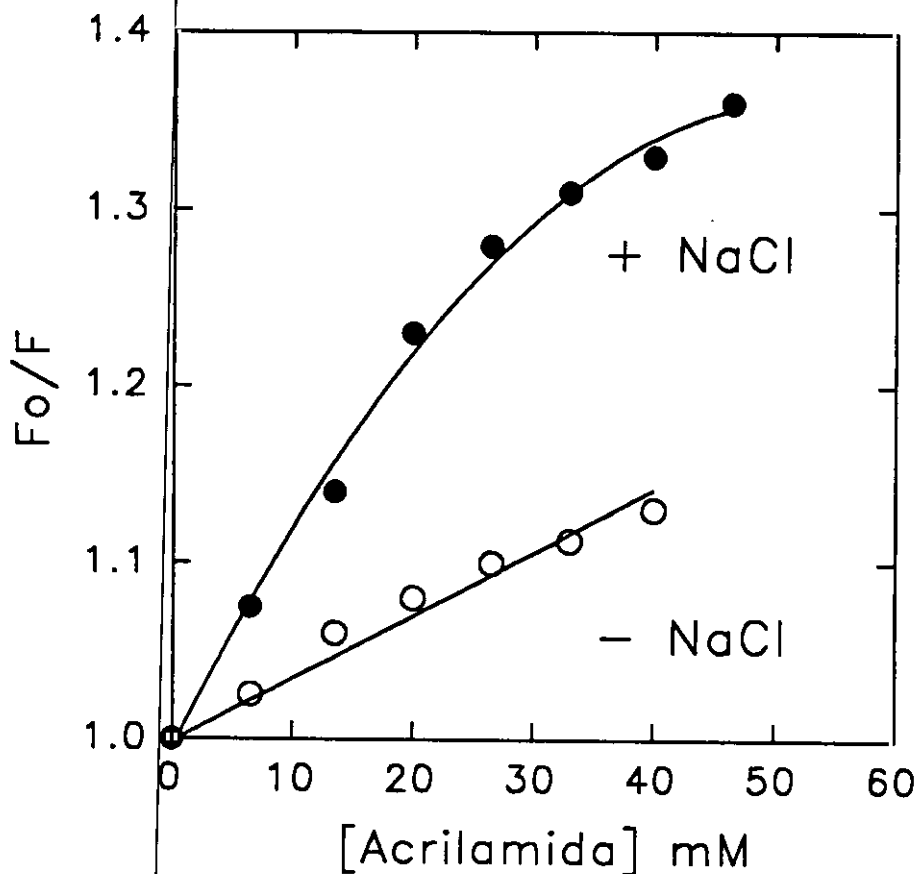
es mayor que a baja fuerza iónica ( $K_w = 2.35 \text{ M}^{-1}$ ). Además, a fuerza iónica fisiológica el apagamiento de la fluorescencia de la SP-A no sigue una relación lineal con el incremento de la concentración de acrilamida, a diferencia de lo que ocurre a baja fuerza iónica.



**FIGURA 37.** Variación de la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A de cerdo en función de la concentración de NaCl.

Los experimentos se llevaron a cabo a 20°C. La SP-A (10  $\mu\text{g/ml}$ ) se añadió en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 en presencia o ausencia de EDTA 1 mM. El intervalo entre adiciones sucesivas de NaCl fue 3 minutos.  $F_o$  y  $F$  son las intensidades de emisión de fluorescencia a 330 nm de SP-A en ausencia y presencia de NaCl, respectivamente. La longitud de onda de excitación utilizada fue 275 nm.

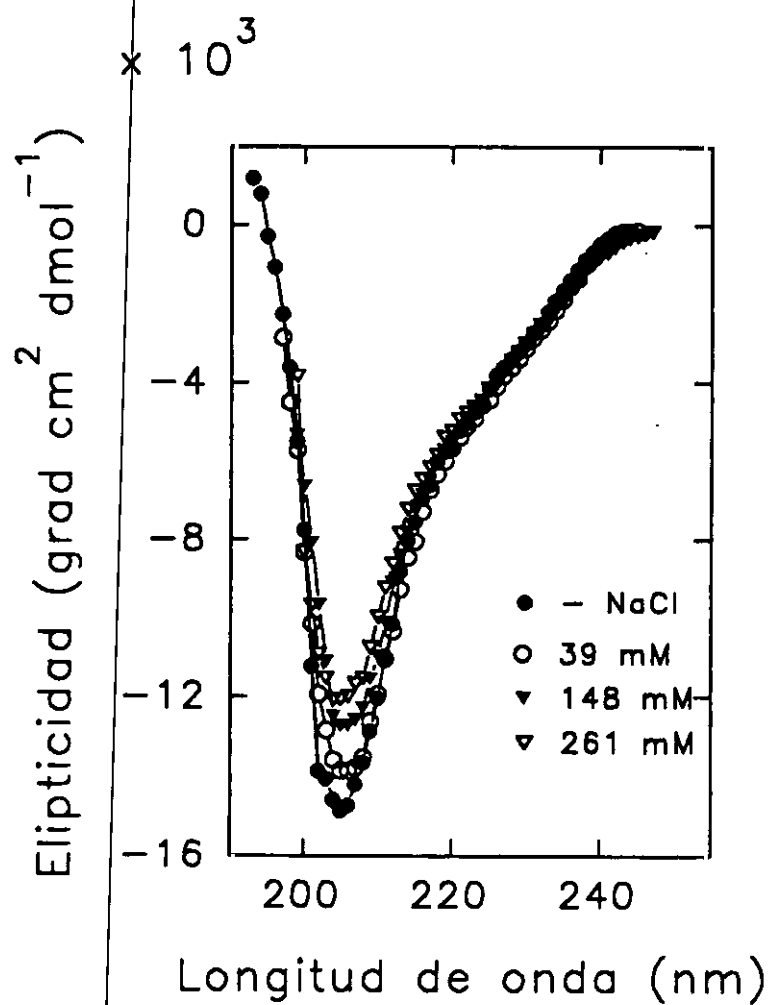
Estos resultados indican que, en este estado de agregación, los residuos de triptófano de la SP-A son más susceptibles al apagamiento colisional por acrilamida, siendo la accesibilidad de las dos poblaciones de triptófano al agente de "quenching" diferentes, tal y como ocurría con la SP-A agregada a concentraciones de calcio milimolares.



**FIGURA 38.** Representación de Stern-Volmer del apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la SP-A por acrilamida en presencia de NaCl 150 mM.

Los experimentos se realizaron a 20°C en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, en presencia o ausencia de NaCl 150 mM. La longitud de onda de excitación fue 295 nm. La concentración de SP-A utilizada fue 6.67  $\mu\text{g/ml}$ .  $F_0$  y  $F$  son las intensidades de emisión de fluorescencia a 330 nm en ausencia y presencia de acrilamida respectivamente.

En la Figura 39 se recogen los espectros de dicroísmo circular de la SP-A en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de NaCl. El espectro de la proteína se modifica a medida que se incrementa la fuerza iónica del medio. Se reduce el valor de elipticidad negativa y se modifica la forma del espectro. Los cambios son menos drásticos que los que se producen en presencia de calcio milimolar. Como se observa en la Figura 40, no se modifica prácticamente el valor de elipticidad a 222 nm, y sí lo hace a 205 nm. La representación de la relación de elipticidades a 205 y 222 nm frente a la concentración de NaCl del medio muestra que el proceso se satura a una concentración de NaCl 150 mM. Al igual que en el caso de la proteína autoagregada en presencia de calcio milimolar, la reducción del valor de elipticidad negativa a 205 nm al incrementarse la concentración de NaCl en el medio podría indicar que, como consecuencia del proceso de autoagregación inducido por el NaCl, se producen cambios estructurales en la SP-A que podrían estar asociados a cambios en el dominio colagénico de la proteína.



**FIGURA 39. Espectros de dicroísmo circular de la SP-A de cerdo en presencia de concentraciones crecientes de NaCl.**

La SP-A (0.1 mg/ml) se añadió en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4. A continuación se añadieron sucesivas alícuotas de tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, NaCl 2 M.

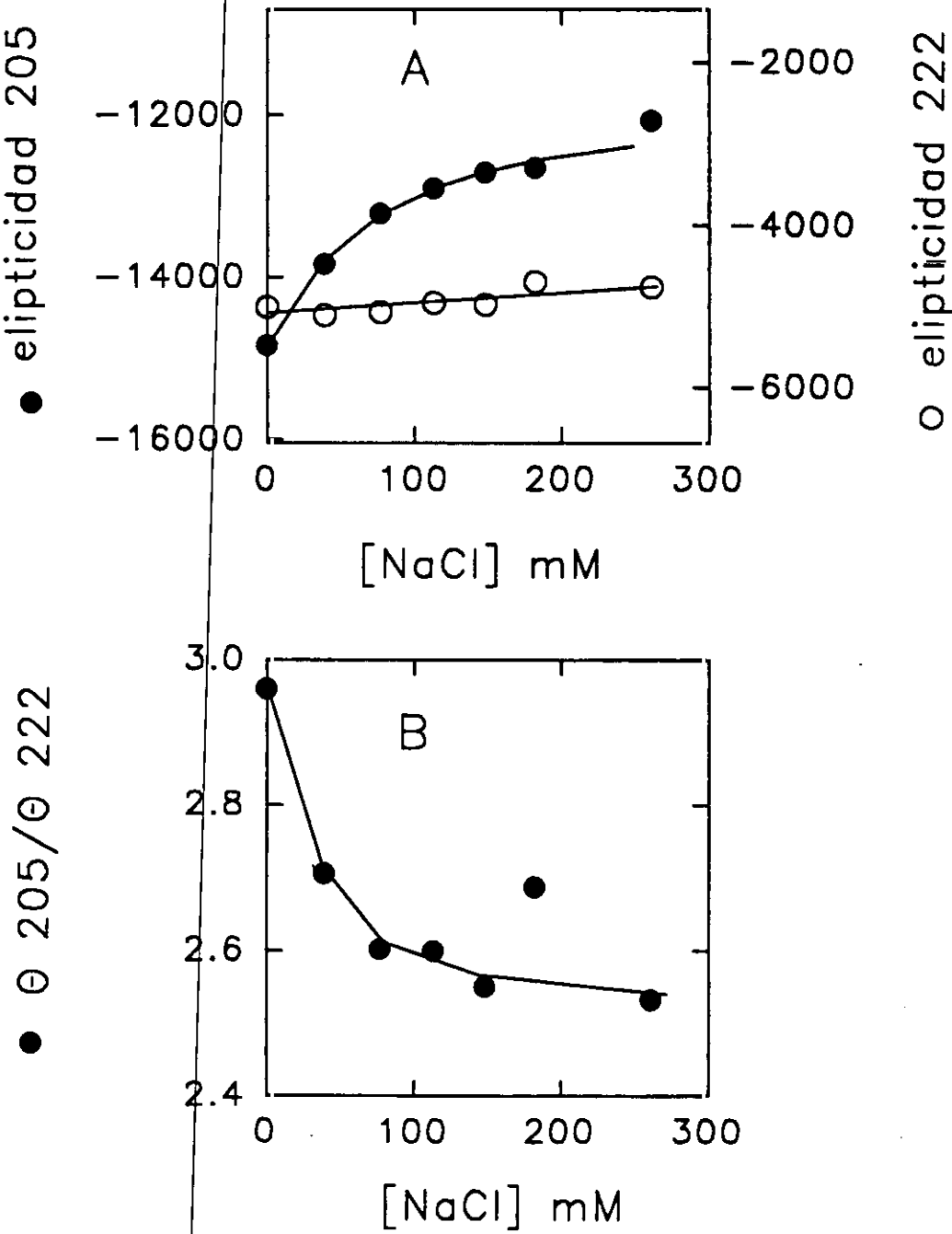


FIGURA 40. Variación de los valores de elipticidad a 205 y 222 nm, y de la relación  $\theta_{205}/\theta_{222}$  en función de la concentración de NaCl.

#### 4.2.7. EFECTO DEL PH ACIDO SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA SP-A

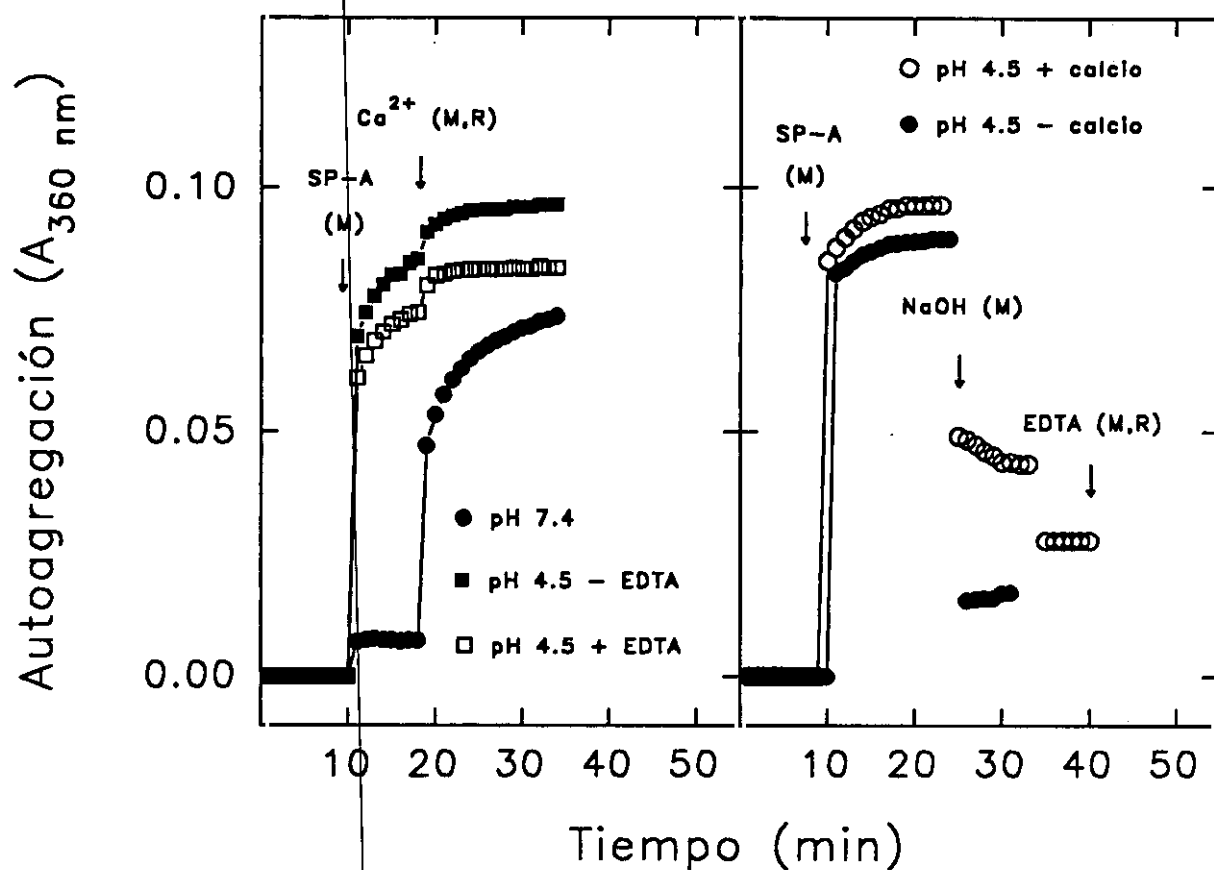
##### 4.2.7.1. Autoagregación de la SP-A a pH ácido

La SP-A es una proteína ácida. Su punto isoeléctrico es de 4.6-5.2 (Benson et al., 1985; Floros et al., 1985; Weaver et al., 1986), dependiendo de la especie estudiada. Por ello, al pH fisiológico la SP-A presenta carga neta negativa. Los resultados que aparecen en esta memoria muestran que el NaCl induce autoagregación de la SP-A (Apartado 4.2.2., figura 22) probablemente neutralizando las cargas negativas superficiales de la proteína, evitando la repulsión electrostática debida a estas cargas, y por tanto, permitiendo la existencia de interacciones proteína-proteína que conducen a la autoasociación de la SP-A. Por tanto, es lógico pensar que la acidificación del medio podría inducir también autoagregación de la proteína. Un aumento en la concentración de protones podrían inducir cambios en la estructura de la proteína que podrían ser de gran importancia, teniendo en cuenta que el surfactante se almacena en los cuerpos lamelares, que tienen un pH ácido (Chander et al., 1986).

Un primer objetivo fue el estudio de la autoagregación de la SP-A a pH ácido. Como se aprecia en la figura 41 A, la SP-A de cerdo autoagrega a pH ácido. A diferencia de la autoagregación a pH neutro, a pH ácido no se inhibe en presencia de EDTA 1 mM. Por tanto, a pH ácido no se requiere la presencia de calcio micromolar para que se produzca la autoagregación de la proteína. Aunque el EDTA no inhibe la autoagregación de la proteína a pH ácido, los valores de absorbancia que se alcanzan en presencia de EDTA son inferiores a los que se dan en ausencia de este agente quelante de iones divalentes. De igual manera, tanto en presencia como en ausencia de EDTA 1 mM, la adición de calcio 5 mM incrementa un 10% los valores de absorbancia obtenidos antes de la adición de calcio, lo que sugiere un efecto aditivo de ambos agentes: protones y calcio, sobre la autoagregación de la SP-A.

El proceso de autoagregación inducido por el pH ácido se revierte tras la adición de NaOH, a la concentración necesaria para cambiar el pH ácido (4.5) a neutro (7.0) (Figura 41 B). Cuando se añade NaOH a la muestra de SP-A autoagregada a pH 4.5 en presencia de calcio milimolar sólo se revierte parte de la agregación (Figura 41 B).





**FIGURA 41. Autoagregación de la SP-A de cerdo a pH ácido.**

Los experimentos se llevaron a cabo a 37°C en tampón Tris-HCl 25 mM, Acetato Sódico 25 mM, pH 4.5, en presencia o ausencia de EDTA 1mM, y en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4. (M) indica que el reactivo se añadió en la cubeta de muestra; (M,R) indica que se añadió en las cubetas de muestra y referencia. Las concentraciones de SP-A, y calcio fueron 50  $\mu\text{g/ml}$  y 5 mM, respectivamente. A) Agregación de la SP-A a pH ácido y pH neutro. B) Reversión de la agregación a pH ácido por NaOH.

Los valores de absorbancia que se alcanzan a pH 4.5 son mayores que los que se producen a pH 7.4 en presencia de calcio 5 mM o NaCl 150 mM, lo que demuestra una gran tendencia de la SP-A a la autoasociación a pH ácido. Esta facilidad de la SP-A para autoagregar, así como la independencia de calcio del proceso de autoagregación de la SP-A a pH ácido, sugieren que los mecanismos moleculares a través de los cuales se produce la autoagregación de la SP-A a pH neutro y pH ácido son distintos. El siguiente objetivo del

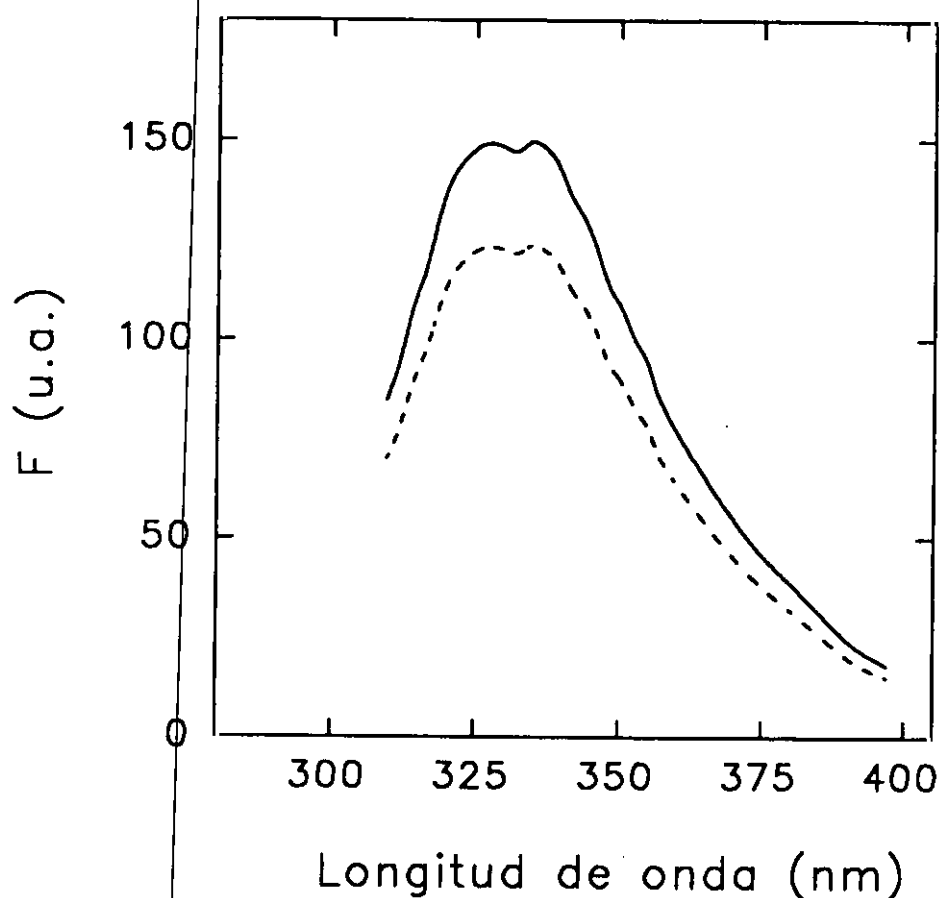
trabajo ha sido estudiar los cambios estructurales que se producen en la SP-A como consecuencia del proceso de autoagregación a pH ácido.

#### 4.2.7.2. Cambios estructurales en la forma agregada de la SP-A a pH ácido

Los cambios que se producen en la estructura de la SP-A como consecuencia de la autoagregación de la proteína a pH ácido se han estudiado mediante espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular. En la Figura 42 se observa que, a pH 4.5 se produce una disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A sin que se modifique la longitud de onda de los máximos de emisión. Estos resultados indican que, como consecuencia de la autoagregación de la SP-A se produce un cambio conformacional en la proteína en virtud del cual los fluoróforos de la SP-A están menos protegidos frente al apagamiento provocado por el disolvente o por grupos polarizables de la propia proteína. La no existencia de desplazamientos de los máximos de emisión indican que no se modifica la polaridad del microentorno en el que se encuentran los residuos de triptófano de la SP-A.

Los estudios de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la SP-A por acrilamida a pH 7.4 y pH 4.5 se recogen en la Figura 43. Se observa que, a pH ácido, se incrementa la fracción de fluorescencia de la SP-A susceptible de ser apagada por la acrilamida. La constante de Stern-Volmer es mayor ( $K_{sv} = 17.52 \text{ M}^{-1}$ ) a pH ácido que a pH Neutro ( $K_{sv} = 2.35 \text{ M}^{-1}$ ). Además, a pH ácido la representación de Stern-Volmer del apagamiento de la fluorescencia de la SP-A por acrilamida no es lineal, sino curvada hacia abajo. Como se ha discutido previamente, en el caso de proteínas con más de un residuo de triptófano, como es el caso de la SP-A, estos resultados pueden interpretarse como resultado de una diferente de accesibilidad de los dos triptófanos de la SP-A a la acrilamida.

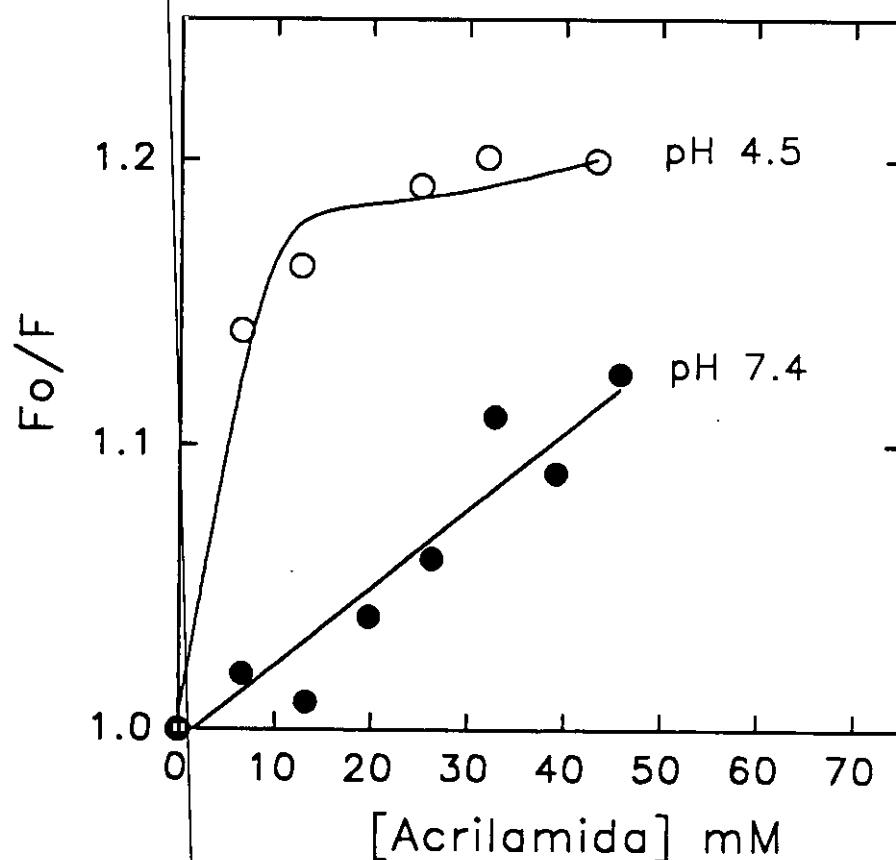
Para profundizar en los cambios inducidos por la autoagregación de la SP-A a pH ácido sobre la estructura de la SP-A, se ha comparado el espectro de dicroísmo circular de la SP-A a pH neutro y pH ácido. Se observa (Figura 44) que se produce una significativa alteración del espectro de dicroísmo circular de la SP-A con respecto al mismo espectro de la proteína a pH neutro. Se aprecia una marcada disminución del extremo negativo a 205 nm, lo que podría indicar que, como consecuencia de la autoagregación de la SP-A a pH ácido,



**FIGURA 42.** Espectro de emisión de fluorescencia de la SP-A a pH ácido.

Los espectros se han registrado a 20°C utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm. La SP-A (10  $\mu\text{g/ml}$ ) se añadió en tampón Tris-HCl 25 mM, Acetato 25 mM, pH 4.5 (línea de trazo discontinuo) o en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 (línea de trazo continuo).

se producen cambios en la estructura secundaria de la SP-A asociados a cambios en el dominio colagénico de la proteína. Sin embargo, no se puede descartar que la dispersión provocada por la autoagregación de la proteína a pH ácido pueda contribuir a la disminución de la elipticidad negativa a 205 nm. La dispersión produce artefactos en los espectros de

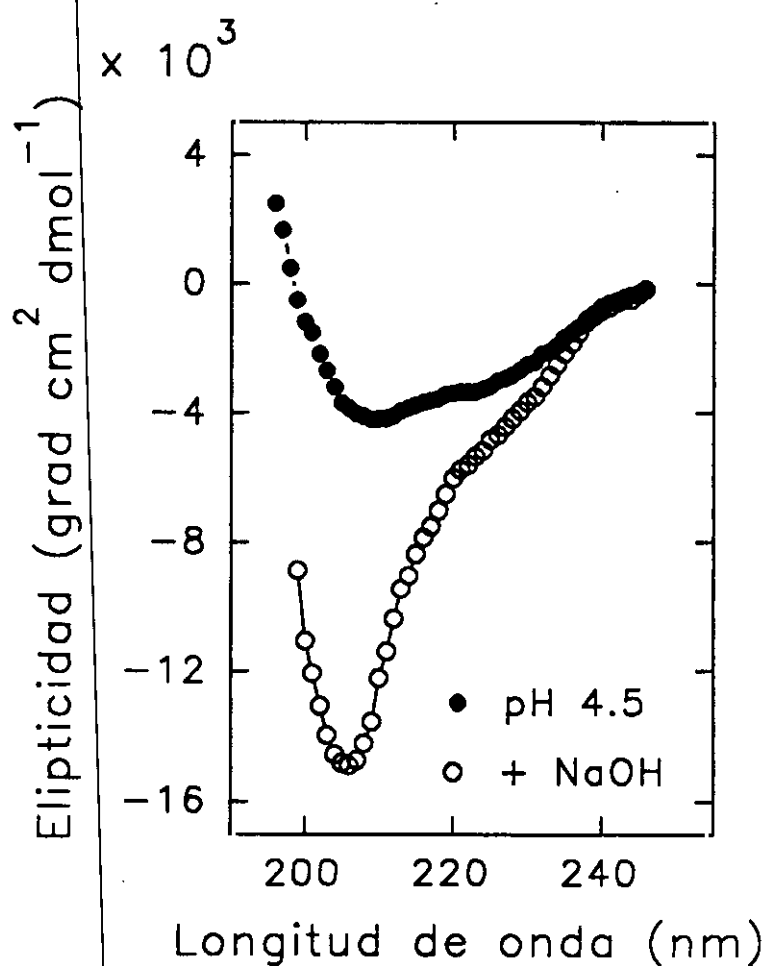


**FIGURA 43.** Representación de Stern-Volmer del apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la SP-A de cerdo por acrilamida a pH ácido.

Los experimentos se realizaron a 20°C en tampón Tris-HCl 25 mM, Acetato sódico 25 mM, pH 4.5 o tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4. La longitud de onda de excitación fue 295 nm. La concentración de SP-A utilizada fue 6.67  $\mu\text{g/ml}$ .  $F_0$  y  $F$  son las intensidades de emisión de fluorescencia a 330 nm en ausencia y presencia de acrilamida, respectivamente.

dicroísmo circular que se manifiestan, en muchos casos, en disminución de la señal de dicroísmo. Al adicionar NaOH al medio se obtiene de nuevo el espectro característico de la SP-A a pH neutro, lo que indica que el proceso es reversible, y que la disminución observada en los valores de elipticidad no pueden atribuirse a precipitación de la proteína a pH ácido.

El espectro de dicroísmo circular de la SP-A a pH ácido muestra un hombro más acusado a 220 nm que los espectros de la SP-A registrados en presencia de calcio milimolar o NaCl, lo que podría sugerir que el contenido de Ó-hélice de la SP-A a pH ácido es mayor que a pH neutro en presencia de calcio (5 mM) o cloruro sódico (150 mM).



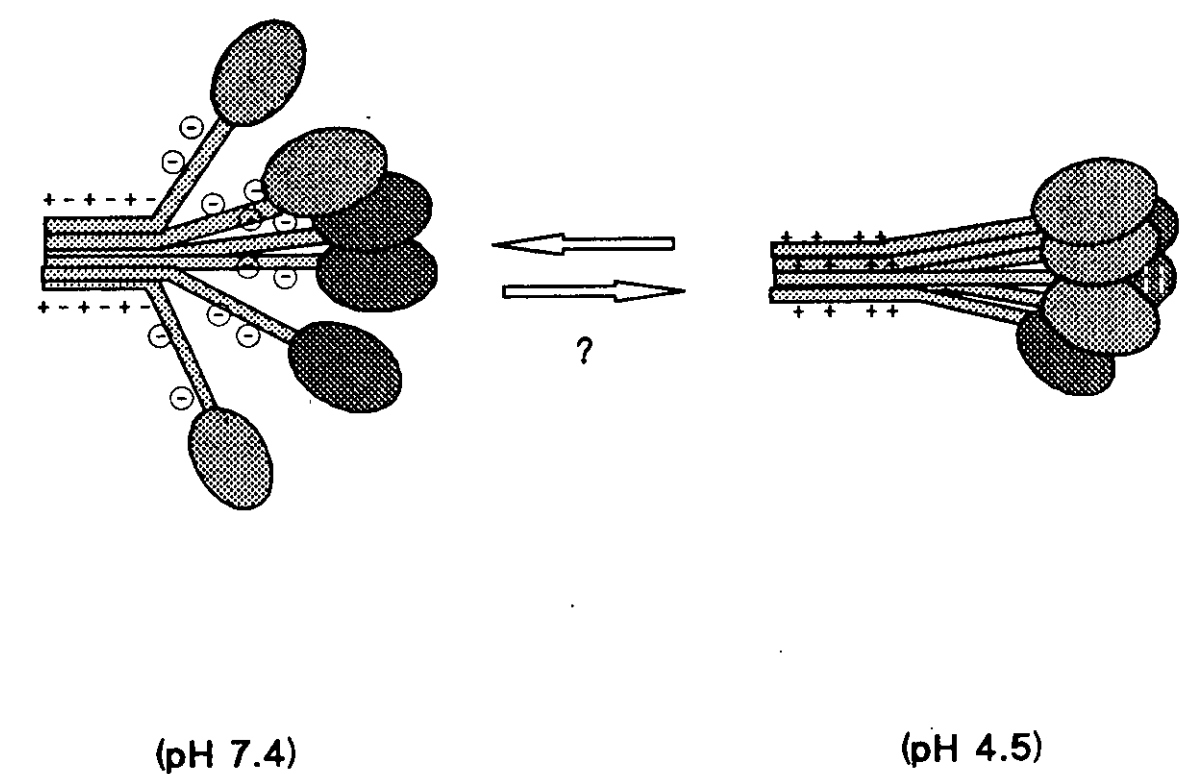
**FIGURA 44. Espectros de dicroísmo circular de la SP-A de cerdo a pH ácido.**

La SP-A (0.1 mg/ml) se añadió en tampón Tris-HCl 25 mM, acetato sódico 25 mM, pH 4.5. Tras registrarse el espectro de la proteína a pH ácido se añadió NaOH 0.1 N hasta neutralizar el pH de la solución, registrándose de nuevo el espectro de la proteína.

Aunque los mecanismos moleculares a través de los cuales se produce la autoagregación a pH ácido y pH neutro sean probablemente distintos, la estructura de la SP-A se modifica de manera muy semejante en ambos casos; al menos las variaciones observadas en los espectros de fluorescencia, en el apagamiento de la fluorescencia por acrilamida y en los espectros de dicroísmo circular son cualitativamente semejantes. Como se ha discutido previamente, tanto los resultados que aparecen en esta memoria, como algunos datos existentes en la bibliografía, apoyan la hipótesis de que la autoagregación de la SP-A a pH neutro en presencia de calcio milimolar o fuerza iónica se produce a través de interacciones entre los dominios colagénicos (Apartado 4.2.3.). El hecho de que la estructura de la SP-A se modifique de manera similar como consecuencia de la autoagregación de la proteína a pH neutro y a pH ácido podría sugerir que la autoasociación de la proteína a pH ácido podría llevarse a cabo mediante interacciones entre las regiones colagénicas de distintas moléculas de SP-A, aunque los datos de los que se dispone no indican de una manera clara que sea así.

Se han descrito cambios estructurales inducidos por el pH ácido que afectan al dominio de reconocimiento de carbohidratos en lectinas tipo C. Así, el receptor de asialoglicoproteínas de los hepatocitos, que interviene en la internación de glicoproteínas mediante un proceso de endocitosis mediada por receptor, y tiene un dominio de reconocimiento de carbohidratos homólogo al de las colectinas, sufre un cambio conformacional inducido por el pH ácido de los endosomas, que reduce la afinidad del receptor por el ligando, lo que conduce a la disociación del complejo receptor/glicoproteína (Di Paola et al., 1984). "In vitro", el pH ácido induce un cambio conformacional tanto en el receptor como en un fragmento que retiene la actividad de unión de carbohidatos, obtenido mediante digestión del receptor con subtilisina. Al acidificar el medio se incrementa 10 veces el requerimiento de calcio necesario para que se produzca la unión de azúcares al receptor (Loeb y Drickamer, 1988). Es interesante que en los dos sitios de unión de calcio de la MBP estén implicados residuos de Asp, Glu y Asn, que están conservados en todas las colectinas y lectinas tipo C (Weiss et al., 1991). De acuerdo con los resultados obtenidos, es probable que la protonación de los grupos carboxilo de los aminoácidos ácidos podría reducir la afinidad de la proteína por el calcio. Sería interesante estudiar cómo están afectadas algunas de las propiedades de la SP-A dependientes de la unión de calcio a la proteína. Las alteraciones en la actividad de agregación de vesículas han sido estudiadas en el apartado 4.4. de esta memoria. Recientemente Haurum et al. (1993) han publicado que la unión de la SP-A a carbohidratos disminuye a pH ácido (4-5). Si el sitio de unión de calcio de alta afinidad

se encuentra en el dominio de reconocimiento de carbohidratos de la SP-A, como sostienen Haagsman et al. (1990), la protonación de las cadenas laterales de esos aminoácidos, posiblemente esenciales para la unión de calcio, podría explicar por qué el proceso de autoagregación de la SP-A a pH ácido es independiente de la presencia de calcio micromolar.



**FIGURA 45. Modelo estructural de la SP-A a pH neutro y pH ácido.**

En la Figura 45 se representa un modelo del cambio estructural que podría producirse en la SP-A a pH ácido. La zona de unión del dominio colagénico con el de reconocimiento de carbohidratos es una zona hidrofóbica con abundancia de residuos ácidos que, al pH fisiológico presentarán carga negativa. La secuencia de esa zona es

compatible con la existencia de una Ó-hélice anfipática (Mc Lean et al., 1993). La presencia de cargas negativas en esa región podría contribuir a la separación que se produce entre protómeros de la SP-A para formar la característica estructura de "ramo de flores" de la SP-A. La protonación de las cadenas laterales de esos residuos a pH ácido eliminaría esas cargas, y permitiría una asociación más estrecha entre los protómeros de la SP-A. La estructura de la SP-A a pH ácido sería más compacta, lo que podría ser importante para facilitar la integración de la SP-A en el sistema de bicapas lipídicas altamente empaquetadas en los cuerpos lamelares. La estructura de la SP-A a pH neutro sería más abierta y flexible, compatible con la organización de las lamelas de los cuerpos lamelares en la mielina tubular.

#### 4.2.8. SUMARIO

Los resultados que se muestran en esta memoria sugieren que la SP-A a pH neutro presenta dos conformaciones: una, que se podría llamar activa, determinada por la unión de calcio a un sitio de alta afinidad, presumiblemente localizado en el dominio C-terminal de la proteína, y otra inactiva, en ausencia de calcio. La unión de calcio a este sitio de alta afinidad induce cambios en la estructura de la proteína que se manifiestan mediante espectroscopía de fluorescencia y susceptibilidad a la hidrólisis por tripsina. La unión de calcio al sitio de alta afinidad no induce autoagregación de la SP-A. Para que se produzca la autoasociación de la proteína a pH neutro se requiere no sólo que el calcio esté unido a ese sitio de alta afinidad, sino también la presencia de calcio en concentraciones más altas (del orden milimolar) o un incremento de la fuerza iónica. El mecanismo a través del cual estos agentes inducen la autoagregación de la SP-A probablemente es distinto. Mediante ensayos de proteólisis por tripsina se observa distinta susceptibilidad a la hidrólisis de las formas agregadas de SP-A a pH neutro (inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  o NaCl). El calcio podría unirse a un sitio de alta afinidad, dependiente de la presencia del dominio colagénico de la proteína, mientras que el NaCl podría apantallar la repulsión debida a la densidad de carga negativa superficial de la SP-A.

La desglicosilación de la SP-A, o la presencia de manano, no inhiben la autoagregación de la proteína. Por tanto, no parece probable un mecanismo de autoagregación de la SP-A basado en la unión de las cadenas de azúcares de una



molécula de SP-A al sitio de unión de carbohidratos de otra molécula de SP-A. Por otro lado, las formas agregadas de SP-A (en presencia de calcio milimolar o fuerza iónica fisiológica) son más susceptibles a la hidrólisis por tripsina que las formas no agregadas (en presencia de EDTA o de calcio  $5\mu\text{M}$ ). Teniendo en cuenta que la zona de colágeno de la SP-A no se digiere por tripsina, estos resultados sugieren que la autoagregación de la proteína implica interacciones entre los dominios colagénicos, y no entre los dominios globulares, de distintas moléculas de SP-A.

La autoagregación de la SP-A a pH neutro (tanto inducida por  $\text{CaCl}_2$  milimolar como por  $\text{NaCl}$ ) inducen cambios estructurales en la proteína que se pueden seguir mediante espectroscopía de fluorescencia, dicroísmo circular y susceptibilidad a la hidrólisis por tripsina).

A pH ácido, el proceso de autoagregación de la SP-A es independiente de la unión de calcio al sitio de alta afinidad. La extensión de la agregación a pH ácido es mayor que a pH neutro. Estos hechos indican que probablemente el mecanismo molecular a través del cual se produce el proceso de autoagregación sea distinto en ambos casos.

La autoagregación de la SP-A a pH ácido induce cambios estructurales en la SP-A que se pueden estudiar mediante espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular. Las variaciones observadas para la SP-A autoagregada a pH ácido son cualitativamente semejantes a las que se producen para la SP-A autoagregada a pH neutro, en presencia de calcio milimolar o fuerza iónica fisiológica, lo que podría sugerir que el proceso de autoagregación de la SP-A a pH ácido se produce mediante interacciones entre los dominios colagénicos de diferentes moléculas de SP-A. De acuerdo con los resultados obtenidos se propone un modelo del cambio estructural que se produce en la SP-A a pH ácido. La estructura de la proteína a pH 4.5 sería más compacta, permitiendo la integración de la SP-A en los cuerpos lamelares. A pH neutro la estructura de la SP-A sería más abierta. Los cambios estructurales de la SP-A al modificarse el pH del medio podrían tener implicaciones en la transformación de los cuerpos lamelares en mielina tubular.

### **4.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS LIPIDOS SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA SP-A. SELECTIVIDAD DE LA SP-A FRENTE A VESICULAS LIPIDICAS**

#### **4.3.1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS**

Una de las propiedades más importantes de la SP-A es su capacidad para unir fosfolípidos. La SP-A se coaisla con los fosfolípidos del surfactante, y está fuertemente asociada con ellos (King y McBeth, 1981; King et al., 1983; Kuroki y AKino, 1991). Todos los estudios realizados hasta la actualidad sobre la interacción de la SP-A con los lípidos se han centrado en: a) los requerimientos estructurales de la SP-A para que se produzca dicha interacción (Haagsman et al., 1991; Ross et al., 1991), b) el análisis del posible sitio de unión de los lípidos a la SP-A (Ross et al., 1986; Voorhout et al., 1991) y c) la importancia de dicha interacción en el metabolismo extracelular del surfactante: formación de mielina tubular (Suzuki et al., 1989; Williams et al., 1991), adsorción de los lípidos a la interfase aire-líquido (Hawgood et al., 1987) y recaptura del surfactante por los neumocitos tipo II (Wright et al., 1987).

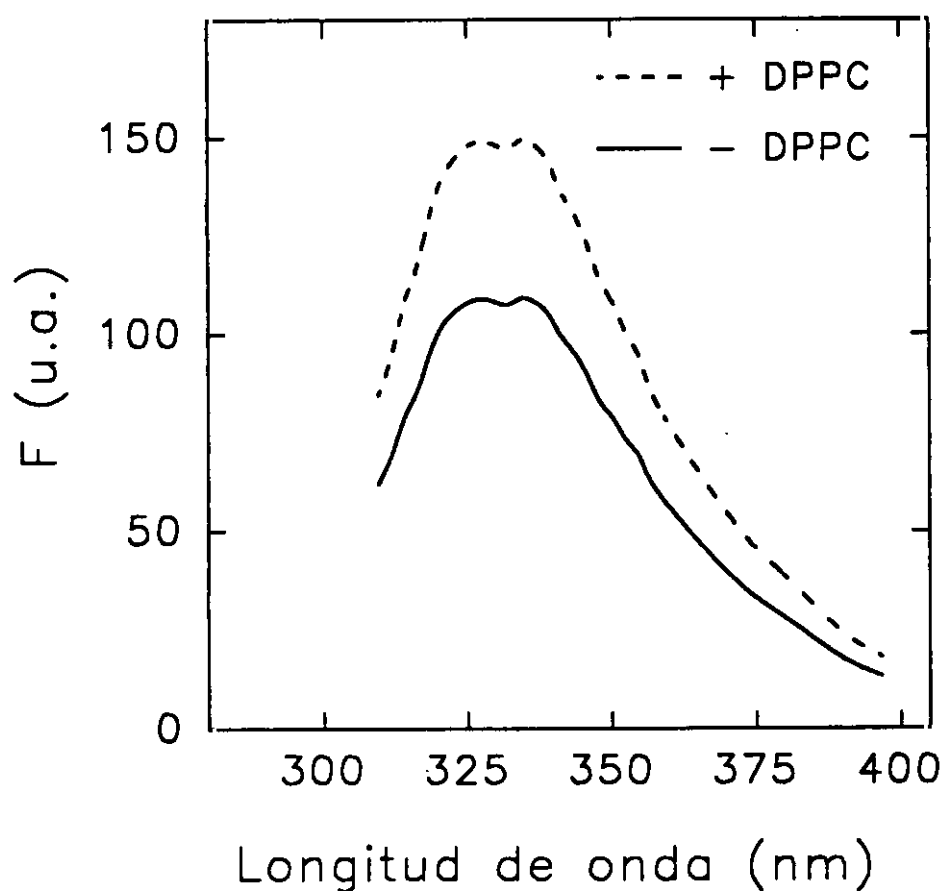
No se ha estudiado hasta el momento el efecto que tienen los lípidos sobre la estructura de la proteína, siendo éste el primer objetivo de este apartado. Este estudio se ha realizado mediante técnicas de fluorescencia y dicroísmo circular. El segundo objetivo ha sido analizar el efecto de: a) la naturaleza del grupo polar y cadena de acilo de los fosfolípidos, b) el estado físico de las vesículas lipídicas y c) la fuerza iónica del medio, sobre la interacción lípido/SP-A. Este estudio se ha abordado estudiando la fluorescencia intrínseca de la SP-A (intensidad de emisión de fluorescencia, longitud de onda de emisión

de los máximos de emisión y susceptibilidad al "quenching" por acrilamida) en presencia de distintos tipos de lípidos y en distintas condiciones experimentales.

#### **4.3.2. ESTUDIO DE LA INTERACCION LIPIDO/SP-A. EFECTO DE LOS LIPIDOS SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA SP-A**

En la figura 46 se representa el efecto de la interacción de la SP-A con vesículas de DPPC -fosfolípido característico del surfactante pulmonar- sobre las propiedades fluorescentes de la SP-A. La interacción de la SP-A con vesículas de DPPC da lugar a un incremento de la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A que puede ser interpretado en términos de una mayor protección de los fluoróforos de la SP-A de los grupos polarizables de la propia proteína (puentes disulfuro, grupos sulfidrilo y aminas) o del solvente. Dichos grupos son los responsables del apagamiento de la intensidad de fluorescencia de los residuos de triptófano. Esto supondría un cambio conformacional en la proteína como consecuencia de su interacción con los lípidos.

La existencia de este cambio conformacional está apoyada por los resultados de accesibilidad de los residuos de triptófano a acrilamida registrados en la Figura 47. En presencia de vesículas de DPPC el apagamiento de la emisión de fluorescencia por acrilamida disminuye marcadamente, lo que indica que, debido al cambio conformacional de la proteína, se reduce la accesibilidad de los residuos de triptófano a la acrilamida. Es interesante observar que la representación de Stern-Volmer en ausencia de DPPC no es lineal, sino que se obtiene una desviación de la linealidad hacia abajo. Según Eftink y Ghiron (1976) este tipo de representación puede ser interpretado en términos de una marcada diferencia de accesibilidad a la acrilamida de las distintas poblaciones de residuos de triptófano, en el caso de proteínas que contengan más de una población de residuos de triptófano. En el caso de la SP-A, estos resultados indican que en ausencia de lípidos y a fuerza iónica fisiológica uno de los dos residuos de triptófano es más accesible al agente de "quenching" que el otro. Por otra parte, después de la interacción de vesículas de DPPC con la SP-A a fuerza iónica fisiológica se obtiene una representación de Stern-Volmer lineal, lo que indica, según la teoría de Eftink y Ghiron, que los dos residuos de triptófano de la SP-A tienen la misma accesibilidad al agente de "quenching" como consecuencia del cambio conformacional en la molécula de la proteína producido tras su interacción con DPPC.

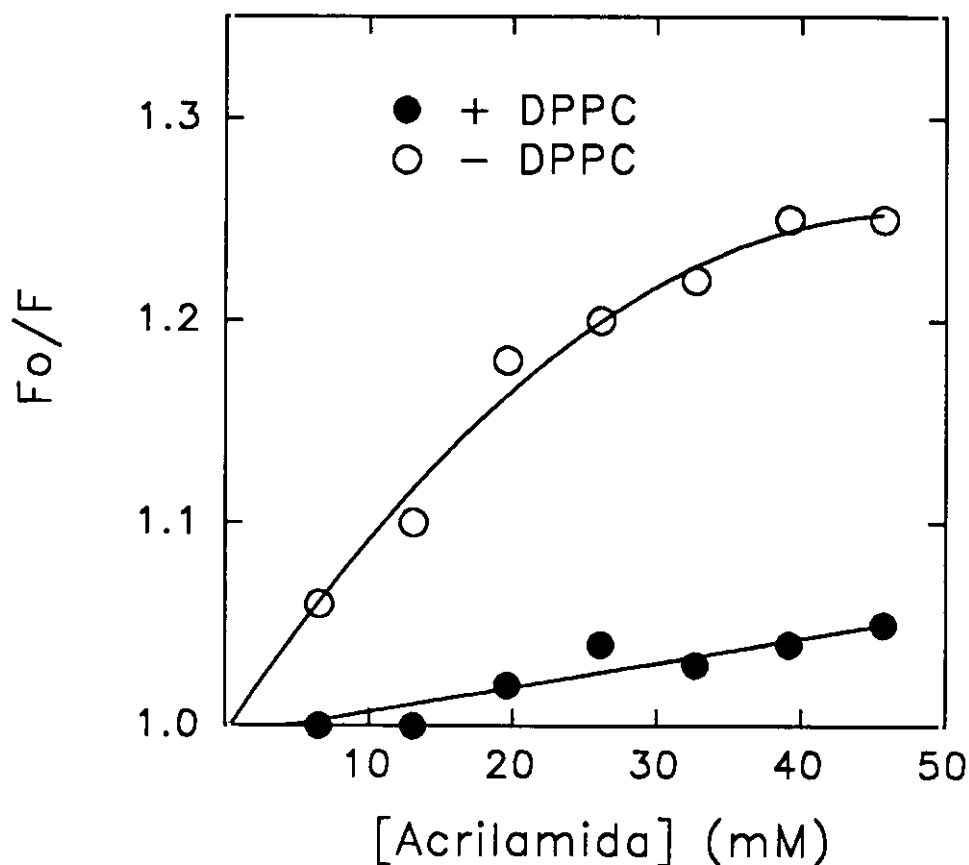


**FIGURA 46. Espectros de emisión de fluorescencia de la SP-A de cerdo en ausencia y presencia de vesículas de DPPC.**

La longitud de onda de excitación utilizada fue de 295 nm. La intensidad de emisión de fluorescencia (F) se expresa en unidades arbitrarias. Los experimentos se llevaron a cabo a 37°C en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 que contiene NaCl 150 mM. Las concentraciones de SP-A y DPPC utilizadas en el ensayo fueron 10 y 40  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

El cambio conformacional que se produce en la SP-A parece ocurrir sin que se modifique la polaridad del microentorno en el que se encuentran los residuos de triptófano, ya que la posición de los máximos de emisión de fluorescencia no se modifica después de la interacción con DPPC. La longitud de onda del máximo de emisión del grupo indol sufre cambios hacia el azul (longitudes de onda menores) o hacia el rojo (longitudes de onda

mayores) cuando la polaridad del microentorno en el que se encuentra disminuye o aumenta, respectivamente (Lakowicz, 1993).



**FIGURA 47. Representación de Stern-Volmer del apagamiento de la emisión de fluorescencia de la SP-A porcina por acrilamida en presencia o ausencia de vesículas de DPPC.**

F y  $F_0$  son las intensidades de emisión de fluorescencia a 330 nm en ausencia y presencia de acrilamida, respectivamente. Los experimentos se llevaron a cabo a 37°C en tampón Tris-HCl 5mM, pH 7.4, que contiene NaCl 150 mM. La longitud de onda de excitación fue 295 nm, y las concentraciones de SP-A y DPPC fueron 10 y 40  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

Los únicos residuos de triptófano encontrados en la SP-A de todas las especies estudiadas están localizados en el dominio C-terminal, en las posiciones 191 y 213 (para un número total de aminoácidos de 228). Por otro lado, el sitio de unión de lípidos en la SP-A no se encuentra en la región C-terminal, sino probablemente en el segmento que une el

dominio de colágeno (N-terminal) y el dominio globular (C-terminal) (Ross et al., 1986), o bien en la región colagénica (Voorhout et al., 1991). Por tanto, los residuos de triptófano se encuentran en una zona alejada del sitio de unión de la DPPC a la SP-A. La ausencia de desplazamiento de las posiciones de los máximos de emisión de los triptófanos de la SP-A tras la interacción con la DPPC está de acuerdo con el hecho de que los residuos de triptófano de la SP-A no se localicen en el sitio de unión de lípidos de la proteína. Un efecto similar, es decir incremento del rendimiento cuántico del triptófano, sin que se produzca un cambio hacia el azul en la longitud de onda del máximo de emisión se ha publicado para la fluorescencia del triptófano de proteínas como la  $\alpha$ -sarcina cuando interacciona con vesículas de DMPC (Gasset et al., 1991) o el proteolípido de la mielina cuando interacciona con LPC (Cockle et al., 1978).

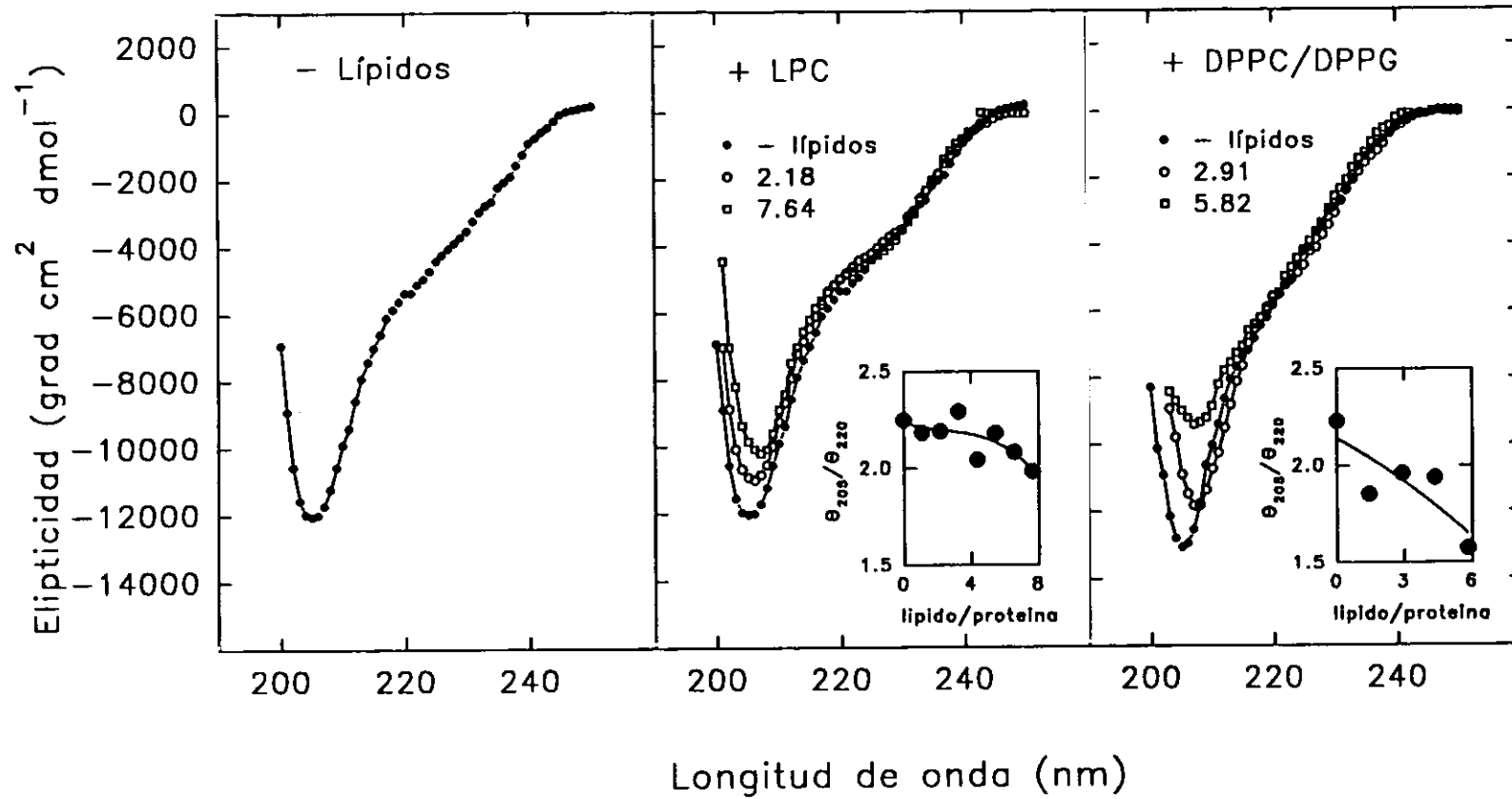
En la Figura 48 se representa gráficamente un modelo de cómo podría producirse un incremento en el rendimiento cuántico de un residuo de triptófano de una proteína sin cambios en la polaridad del microentorno donde se encuentra el triptófano.



**FIGURA 48.** Modelo propuesto para el cambio de las propiedades fluorescentes de la SP-A en presencia de vesículas de DPPC.

Para profundizar en los cambios en la estructura de la SP-A provocados por su interacción con los lípidos, se han realizado estudios de dicroísmo circular de la SP-A en el ultravioleta lejano en ausencia o presencia de vesículas fosfolipídicas y micelas de fosfolípidos (Figura 49).

El espectro de dicroísmo circular de la SP-A se caracteriza por un gran extremo negativo a 205 nm. Es similar al espectro de la proteína C1q, que contiene también un dominio de colágeno y sus subunidades se ensamblan de la misma manera que la SP-A (ver apartado 4.1.5.). En presencia de lípidos, los espectros de dicroísmo circular de la SP-A no se alteran en el intervalo 210-250 nm, mientras que a longitudes de onda inferiores se reduce la elipticidad en presencia tanto de vesículas de DPPC/DPPG como de micelas de LPC. Los resultados con vesículas de DPPC son similares. La relación de elipticidades a 205 y 220 nm se reduce a medida que se incrementa la relación lípido/proteína, como se aprecia en los insertos B y C. El efecto provocado por las vesículas de DPPC/DPPG es mayor que el inducido por la LPC. Estos resultados podrían sugerir que los fosfolípidos producen cambios en la estructura secundaria de la SP-A que podrían estar asociados a cambios en el dominio de colágeno, ya que el tratamiento de la SP-A a temperaturas superiores a 55°C o la digestión de la SP-A con colagenasa da lugar a una disminución importante de la elipticidad negativa a 205 nm (Voss et al., 1988; King et al., 1989; Haagsman et al., 1989) sin variar la elipticidad a 220 nm (Voss et al., 1988; King et al., 1989; Haagsman et al., 1989). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los lípidos disminuyen la relación señal/ruido para longitudes de onda inferiores a 210 nm, por lo que los cambios de elipticidad inducidos por los lípidos en la SP-A podrían no ser suficientemente significativos para asegurar que los lípidos producen cambios en la estructura secundaria de la SP-A. No puede descartarse que la dispersión provocada por las vesículas de DPPC/DPPG afecte al espectro de dicroísmo circular obtenido.



**FIGURA 49. Espectros de dicroísmo circular de la SP-A de cerdo en presencia de cantidades crecientes de fosfolípidos.**

Se representan los espectros de dicroísmo circular de la SP-A en tampón Tris-HCl 5 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4 en ausencia y presencia de micelas de LPC (relaciones lípido/proteína 2.18 y 7.64, en peso) y vesículas de DPPC/DPPG (7:3, en peso) (relaciones lípido/proteína 2.91 y 5.82). La concentración de SP-A utilizada fue 0.11 mg/ml. En los recuadros se representa la variación de la relación de elipticidades a 205 y 220 nm en función de la relación lípido/proteína (en peso).



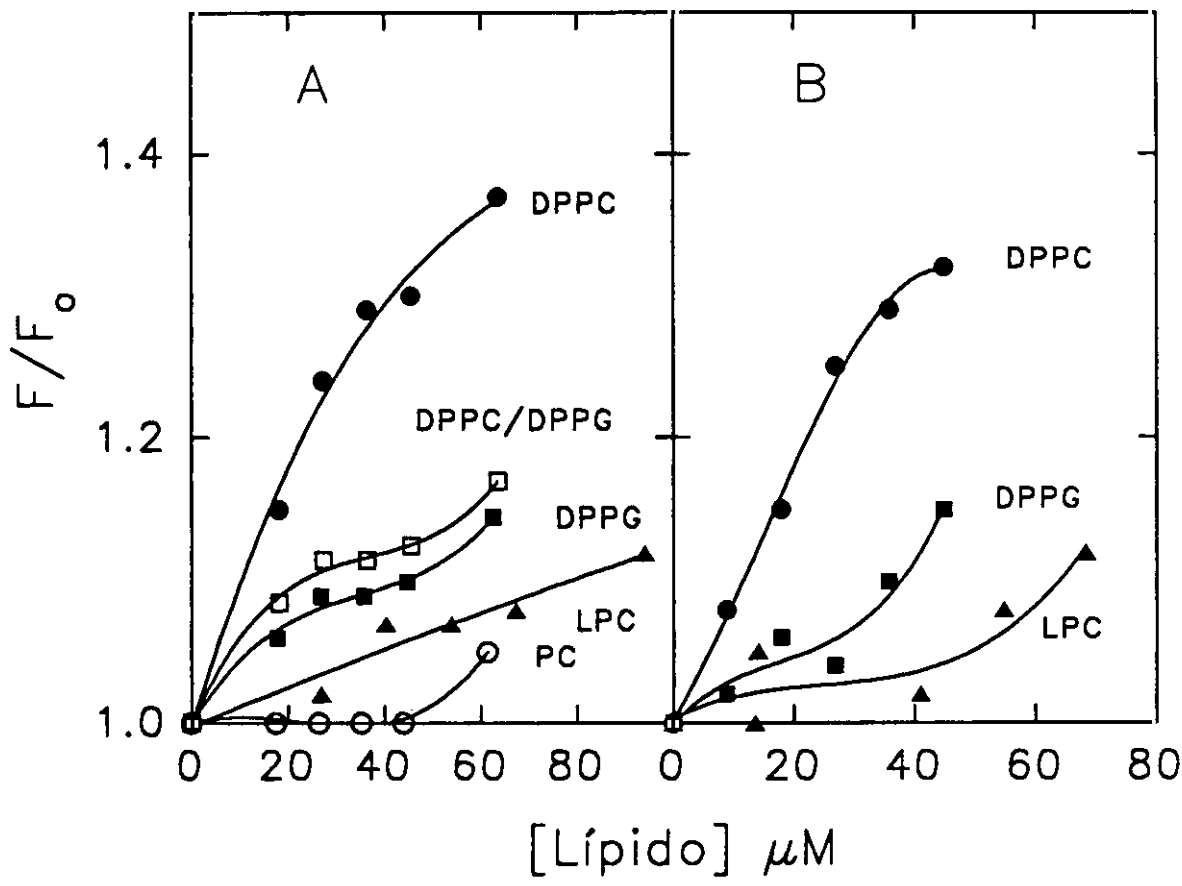
### 4.3.3. EFECTO DE LA NATURALEZA DEL GRUPO POLAR Y CADENA DE ACILO DE LOS FOSFOLIPIDOS SOBRE LA FLUORESCENCIA INTRINSECA DE LA SP-A

El efecto de la naturaleza de la cabeza polar y de la cadena de acilo de los fosfolípidos sobre la interacción lípido/SP-A se ha estudiado observando el cambio del espectro de fluorescencia intrínseca de la SP-A de cerdo y humana en presencia de distintas clases de lípidos. Se ha investigado el efecto de vesículas unilamelares de DPPC, PC de huevo, DPPG y DPPC/DPPG (7:3, en peso) y de micelas de 1-palmitoil-lisofosfatidilcolina (LPC). Los experimentos se han realizado a fuerza iónica fisiológica y a 37°C.

La interacción de la SP-A humana y de cerdo con los distintos tipos de fosfolípidos, a excepción de la PC de huevo, produce un incremento en la intensidad de emisión de fluorescencia de la proteína sin afectar a la posición de los máximos de emisión. (Figura ). La mayor variación en la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A se produce con las vesículas de DPPC, y la mínima en presencia de vesículas de PC de huevo. El aumento de la intensidad de emisión de fluorescencia provocado por las vesículas de DPPG o DPPC/DPPG es menor que el inducido por las vesículas de DPPC, lo que indica que la presencia de cargas negativas en la cabeza polar de los fosfolípidos reduce la interacción de éstos con la SP-A. Por otro lado, la interacción de la SP-A con micelas de 1-palmitoil-LPC es menor que la existente con la DPPC. Esto indica que la presencia de un ácido palmítico esterificando la posición sn-2 del glicerol podría ser importante en esta interacción. La SP-A podría reconocer el esqueleto del glicerol y las uniones éster de los fosfolípidos.

Los espectros de fluorescencia se procesaron tal como se describe en materiales y métodos para corregir a) la dispersión provocada por la adición de las vesículas fosfolipídicas b) el efecto de filtro interno y c) la dilución causada por la adición de sucesivas alícuotas de la solución de vesículas en el experimento de titulación. Además, para descartar la posibilidad de que el incremento en la intensidad de fluorescencia emitida por la SP-A fuera un artefacto experimental debido a la dispersión generada por las vesículas utilizadas se han realizado experimentos de titulación utilizando una disolución de N-acetil-triptofanamida (NATA) a la que se añaden cantidades crecientes de DPPC, DPPG, PC de huevo y LPC. A todas las concentraciones de LPC los espectros registrados fueron superponibles con el del

NATA. En el caso de DPPC, DPPG y PC de huevo comienza a incrementarse la emisión de fluorescencia del triptófano a concentraciones de lípidos superiores a 45  $\mu\text{M}$ .



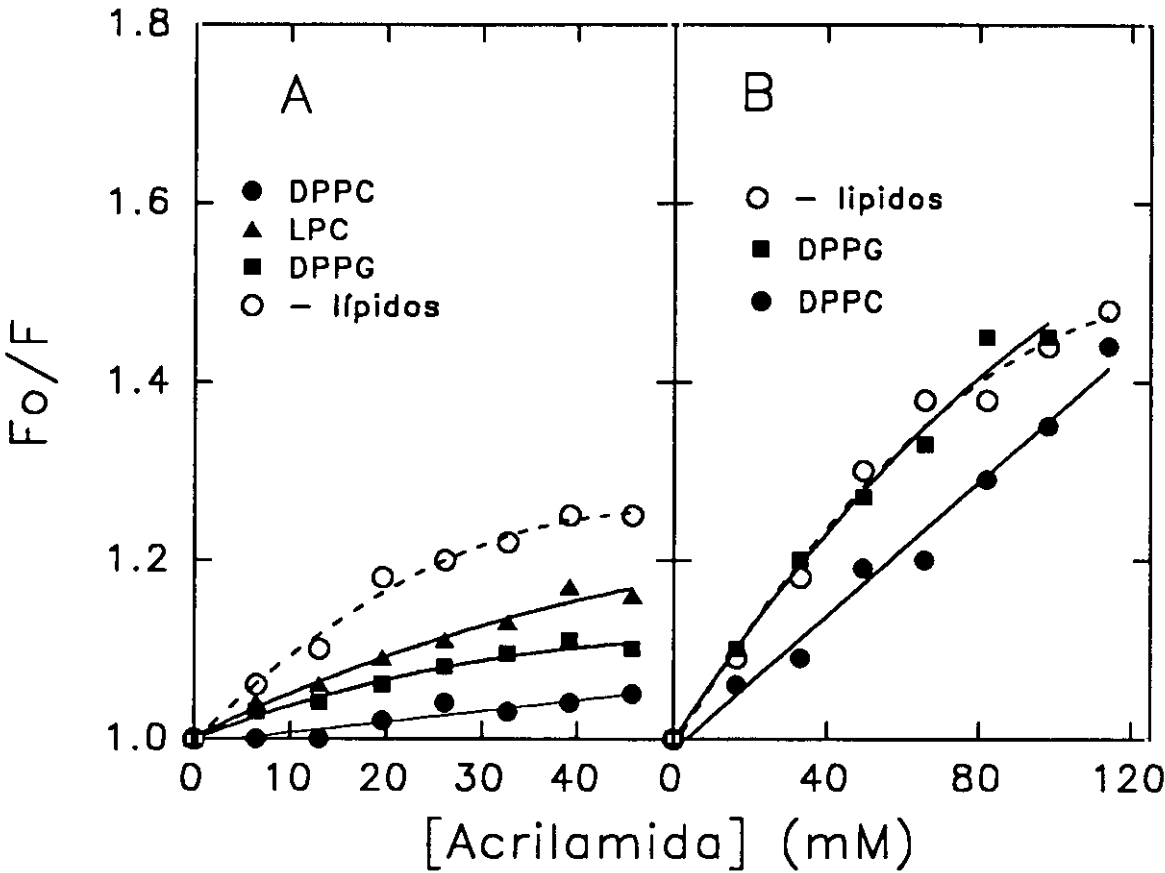
**FIGURA 50. Efecto de distintas clases de fosfolípidos sobre la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A porcina (A) y humana (B).**

$F_0$  y  $F$  son las intensidades de emisión de fluorescencia a 330 nm de la SP-A en ausencia y presencia de fosfolípidos, respectivamente. Los experimentos se llevaron a cabo en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, en presencia de NaCl 150 mM. La concentración de proteína utilizada fue 6.67  $\mu\text{g/ml}$ .

Un criterio adicional para estudiar la interacción de la SP-A con distintas clases de fosfolípidos es el análisis de la accesibilidad de los fluoróforos de la SP-A por la acrilamida. En la Figura 51 se muestra la representación de Stern-Volmer del apagamiento de la fluorescencia de la SP-A de cerdo y humana por acrilamida en ausencia y presencia de

fosfolípidos a una concentración aproximada de 41  $\mu\text{M}$  para las distintas clases de fosfolípidos y de 61  $\mu\text{M}$  para 1-palmitoil-LPC de 61  $\mu\text{M}$ .

La interacción de vesículas lipídicas o micelas de LPC con SP-A porcina o humana no causa una total protección de los residuos de triptófano frente al "quenching" por acrilamida. La extensión de la protección de los residuos de triptófano frente al agente de



**FIGURA 51. Representación de Stern-Volmer del apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la SP-A porcina (A) y humana (B) por acrilamida en presencia de distintas clases de fosfolípidos.**

$F_0$  y  $F$  son las intensidades de emisión de fluorescencia a 330 nm en ausencia y presencia de acrilamida, respectivamente. Los experimentos se han llevado a cabo a 37°C en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 150 mM. La longitud de onda de excitación fue 295 nm. Las concentraciones de SP-A y fosfolípidos fueron 10 y 40  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

"quenching" depende claramente del tipo de lípido que interacciona con la SP-A. Las constantes de "quenching" por acrilamida ( $K_{sv}$ ) de la SP-A humana y porcina, en presencia y ausencia de vesículas de DPPC y DPPG se recoge en la TABLA III.

**TABLA III. Susceptibilidad al apagamiento por acrilamida de la fluorescencia intrínseca de la SP-A porcina y humana en presencia de vesículas de fosfolípidos.**

SP-A	LIPIDOS	$K_{sv}$ ( $M^{-1}$ )
PORCINA	SIN LIPIDOS	9.3
	DPPC	1.2
	DPPG	3.6
HUMANA	SIN LIPIDOS	6.5
	DPPC	3.8
	DPPG	6.0

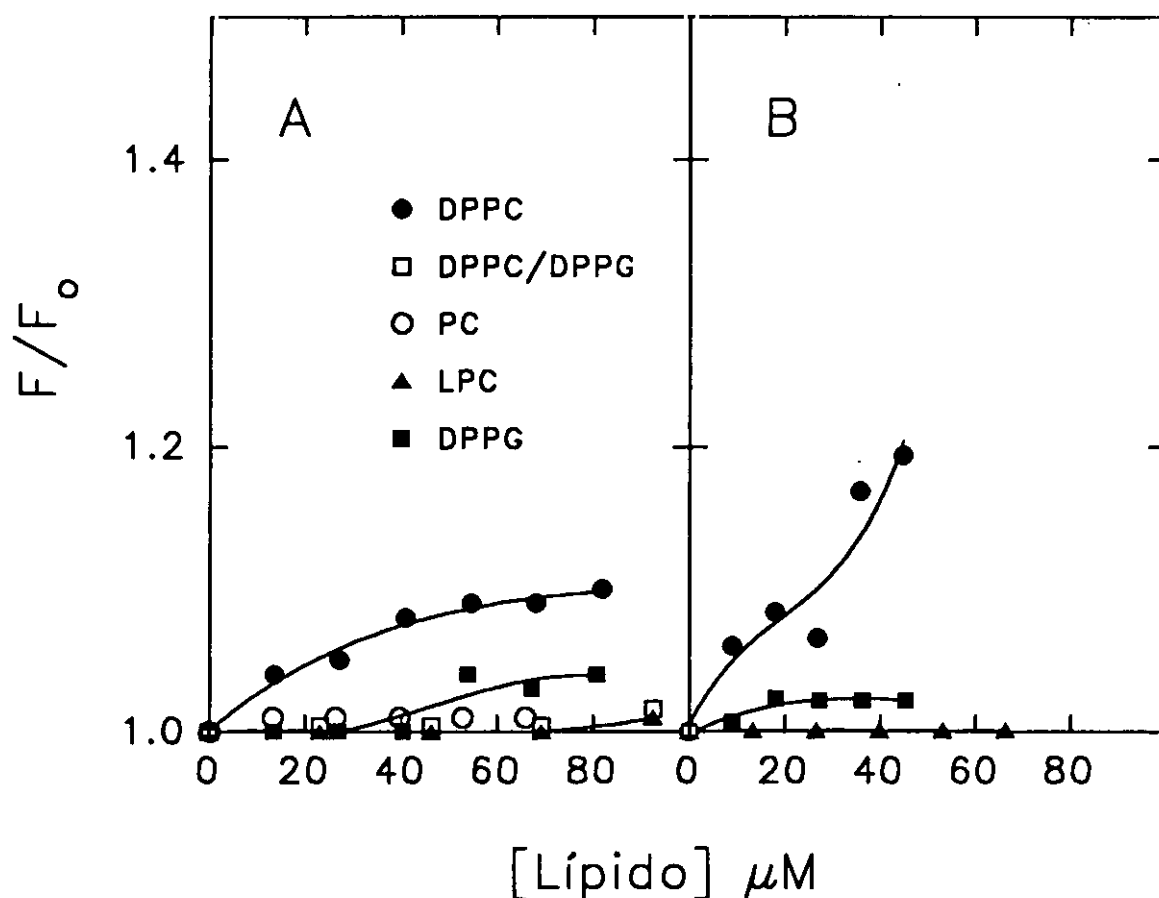
$K_{sv}$  es la constante de "quenching" dinámico de Stern-Volmer.

En el caso de la SP-A porcina, la interacción de vesículas de DPPC con dicha proteína decrece marcadamente la accesibilidad de los fluoróforos de la SP-A a la acrilamida. La interacción de la SP-A de cerdo con vesículas cargadas negativamente de DPPG, o micelas de LPC, produce también cierta protección de los triptófanos frente al "quenching" por acrilamida, aunque dicha protección es mucho menos pronunciada que con vesículas de DPPC. En el caso de la SP-A humana se observa cierta protección de los residuos de triptófano frente al "quenching" por acrilamida en presencia de DPPC, aunque la constante de la SP-A humana en presencia de vesículas de DPPC es mayor que en el caso de la SP-A porcina. Otra diferencia de la SP-A humana con respecto a la porcina es que su interacción con vesículas ácidas de DPPG no varía la accesibilidad de los triptófanos a la acrilamida con respecto a la proteína sin lípidos. Es interesante observar que ambas proteínas, SP-A humana

y porcina, tienen diferentes constantes de "quenching" ( $K_q$ ) en ausencia de lípidos y a fuerza iónica fisiológica ( $K_q$  de la SP-A humana  $6.5 \text{ M}^{-1}$  y  $K_q$  de la SP-A porcina  $9.3 \text{ M}^{-1}$ ) (TABLA III). Esta diferencia podría atribuirse a diferencias en la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas que darían lugar a diferencias en la estructura tridimensional en los alrededores de los residuos de triptófano. De acuerdo con esto, los residuos de triptófano de la SP-A humana estarían más protegidos en la matriz proteica que los de la SP-A porcina, disminuyendo la accesibilidad de los fluoróforos de la SP-A humana a la acrilamida.

Si consideramos que las dos aproximaciones experimentales utilizadas i) cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A en presencia de lípidos y ii) cambios en la accesibilidad de los fluoróforos de la SP-A a la acrilamida en presencia de lípidos pueden ser utilizados como criterios válidos para determinar la magnitud de la interacción lípido-proteína, nuestros resultados claramente indican que la interacción de la SP-A con vesículas de DPPC es mayor que con otros fosfolípidos. La utilización de estas técnicas experimentales ha sido ampliamente utilizada para estudiar la interacción lípido-proteína y selectividad de dicha interacción en diversos estudios en los que se utilizaban péptidos señal (Killian et al., 1990), calpactinas (Pigault et al., 1990), diversos péptido modelo (De Kroon et al., 1990), péptido estimulante de la liberación de gastrina (Cavatorta et al., 1991) y apolipoproteínas humanas (Weinberg et al., 1990).

La selectividad de la SP-A frente a distintas clases de lípidos se ha estudiado recientemente por Kuroki y Akino (1991) utilizando una técnica experimental diferente, que se basa en la unión de  $^{125}\text{I}$ -SP-A a diferentes clases de lípidos adsorbidos en placas de silicagel. Sus resultados indicaron que la SP-A se unía específicamente a DPPC. No se observaba unión a fosfolípidos ácidos como DPPG o PG de huevo, 1-palmitoil-LPC o PC de huevo. Nuestros resultados difieren parcialmente de los obtenidos por Kuroki y Akino (1991) en el sentido de que no observamos una interacción específica de la SP-A con DPPC, sino una interacción preferencial con dicho fosfolípido. Estas diferencias podrían deberse a las distintas aproximaciones experimentales utilizadas para estudiar la interacción de la SP-A con distintas clases de fosfolípidos.



**FIGURA 52.** Efecto de las distintas clases de fosfolípidos sobre la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A porcina (A) y humana (B) a baja fuerza iónica.

$F_0$  y  $F$  son las intensidades de emisión de fluorescencia a 330 nm de la SP-A en ausencia y presencia de fosfolípidos, respectivamente. Los experimentos se llevaron a cabo a 37°C en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 150 mM. La concentración de SP-A utilizada fue 6.67  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.3.4. EFECTO DE LA FUERZA IONICA EN LA INTERACCION LIPIDO/SP-A

Los experimentos descritos en el apartado anterior ponen de manifiesto que la interacción de la SP-A con vesículas de DPPC es más pronunciada que con vesículas de DPPG. Para investigar si la interacción de la SP-A con DPPG pudiese estar incrementada al disminuir la fuerza iónica del medio, se han llevado a cabo experimentos de titulación de

SP-A porcina y humana con distintas vesículas de fosfolípidos a baja fuerza iónica. La Figura 52 muestra que las vesículas que contienen fosfolípidos ácidos como DPPG o DPPC/DPPG no interaccionan con la proteína en estas condiciones. La interacción de la SP-A con vesículas de DPPC a baja fuerza iónica es mucho menor que la que se produce a fuerza iónica fisiológica. La fuerza iónica del medio es, por tanto, un factor importante en la interacción de la SP-A con vesículas de fosfolípidos. Una fuerza iónica fisiológica parece ser un requisito para la interacción de la SPA con vesículas de fosfolípidos, especialmente cuando éstas están cargadas negativamente.

La ausencia de interacción entre la proteína y vesículas ácidas a baja fuerza iónica podría deberse a repulsión electrostática entre la carga negativa de los fosfolípidos y la carga superficial de la proteína debida a los grupos carboxilo. No se conoce la región de la SP-A que está implicada en la interacción con los fosfolípidos. Ross y colaboradores (1986) postularon que la región de la SP-A que une el dominio colagénico con el de estructura globular, entre los aminoácidos Gly<sub>81</sub> y Val<sub>117</sub>, podría ser la zona de la molécula donde se unen los lípidos, ya que proteínas defectivas en los primeros 117 aminoácidos no unen lípidos en absoluto, mientras que el fragmento resistente a colagenasa bacteriana, que carece de los primeros 81 aminoácidos sí lo hace, aunque débilmente. El perfil de hidropatía de la proteína revela que la región que se extiende entre los aminoácidos Gly<sub>81</sub> y Ile<sub>101</sub> se ajusta al modelo de una  $\alpha$ -hélice anfipática, con abundancia de cargas negativas (Mc Lean et al., 1993). Esta región (Gly<sub>81</sub>-Ile<sub>101</sub>), una de las regiones de la SP-A que podría estar implicada en la asociación con los fosfolípidos, presenta una concentración local de carga negativa. La presencia de NaCl podría apantallar la repulsión permitiendo la interacción con vesículas cargadas negativamente.

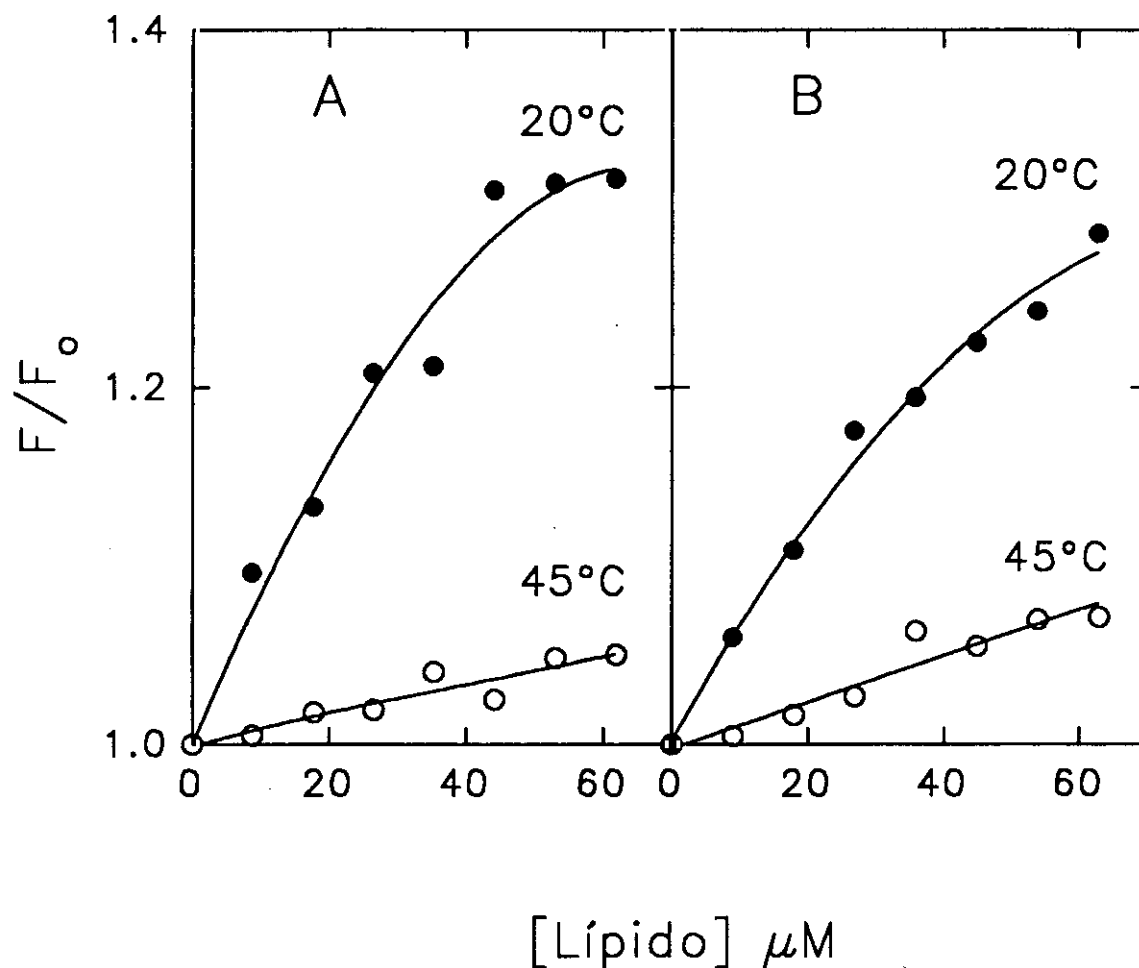
#### 4.3.5. EFECTO DEL ESTADO FISICO DE LOS LIPIDOS EN LA INTERACCION

En los experimentos que se recogen en la Figura 50, realizados en presencia de fuerza iónica fisiológica, se observa que la interacción de la SP-A con vesículas de DPPC provoca un incremento en la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A de cerdo, mientras que en presencia de cantidades equivalentes de PC de huevo no se produce variación en la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A. La diferencia de resultados obtenidos al trabajar con vesículas de DPPC o PC de huevo, cuyos fosfolípidos constituyentes tienen la

misma cabeza polar pero distintas cadenas de acilo, podría explicarse por una interacción específica de la SP-A con las cadenas de acilo saturadas de la DPPC o bien por una preferencia de la SP-A por interaccionar con vesículas en estado gel. A la temperatura a la que se realizan los experimentos de fluorescencia, 37°C, la DPPC se encuentra en el estado gel, ya que su temperatura de transición de fase es de 41.5°C. Sin embargo, la PC de huevo se encuentra en el estado fluido (líquido-cristalino) ya que su temperatura de transición de fase es de -10°C (Ladbroke y Chapman 1969). Para investigar ambas posibilidades se realizaron experimentos de fluorescencia en presencia de vesículas de DPPC a 20 y 45°C. Los resultados aparecen en la Figura 53.

El aumento de intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A humana y porcina obtenidos tras la adición de vesículas de DPPC es mayor a 20 que a 45°C, lo que indica que la interacción de la SP-A con vesículas de DPPC es más fuerte en el estado gel que en el líquido-cristalino. Para excluir la posibilidad de que la reducción de la intensidad de emisión a 45°C se deba a alteraciones estructurales de la proteína a esa temperatura, se realizaron los experimentos a 20°C con proteína nativa y con proteína previamente calentada a 45°C durante diez minutos. Los resultados obtenidos fueron semejantes con las dos proteínas (resultados no mostrados). Además, Haagsman y colaboradores (1989) observaron que la temperatura de transición para la desnaturalización térmica de la triple hélice de colágeno para la SP-A humana y canina es de 52°C. No se han realizado estudios semejantes empleando SP-A de cerdo. Estos resultados, junto con los presentados en el apartado 4.4.7. de esta memoria nos permiten concluir que el estado físico de los fosfolípidos es un factor importante en la interacción lípido/SP-A. El efecto de las vesículas de DPPC sobre la emisión de fluorescencia de la proteína es mayor cuando las vesículas se encuentran en el estado gel que cuando se encuentran en el estado líquido-cristalino. De esta manera, se podría explicar la débil interacción de vesículas de PC de huevo con la SP-A, que a la temperatura en que se realizan los experimentos se encuentra en el estado líquido-cristalino. Estos resultados confirman los obtenidos por King y colaboradores (1986) que demostraron mediante técnicas de sedimentación que la SP-A tiene una marcada preferencia por interaccionar con fosfolípidos disaturados en el estado gel. Otras proteínas muestran un comportamiento semejante, como la fosfolipasa A<sub>2</sub> que se une a bicapas o monocapas de DPPC en un proceso independiente de calcio que requiere que los lípidos se encuentren en el estado gel (Lichtenberg et al 1986; Grainger et al., 1990)





**FIGURA 53.** Efecto del estado físico de las vesículas de DPPC sobre la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A porcina (A) y humana (B).

Los experimentos de titulación se realizaron a 20°C (estado gel) o 45°C (estado líquido-cristalino) en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 150 mM. La concentración de proteína empleada fue 6.67  $\mu g/ml$ .  $F_0$  y  $F$  son las intensidades de emisión de fluorescencia a 330 nm en ausencia y presencia de lípidos respectivamente.

De los estudios realizados parece claro que la interacción de la SP-A con los fosfolípidos produce un cambio conformacional en la proteína, y que la interacción depende tanto de la cabeza polar de los fosfolípidos como del estado físico de las vesículas en la solución acuosa. Así, la interacción de la SP-A con vesículas de DPPC es mayor que con

vesículas de DPPG o de mezclas DPPC/DPPG, que tienen la misma temperatura de transición de fase y los mismos ácidos grasos esterificando las posiciones sn-1 y sn-2 del glicerol, pero distinta cabeza polar. Asimismo, la interacción de la SP-A con la DPPC es mucho mayor que con la PC de huevo, que tiene la misma cabeza polar pero distintas cadenas de acilo y temperatura de transición de fase.

No está resuelto todavía si la SP-A puede penetrar la bicapa e interaccionar específicamente con las cadenas de acilo. Reilly y colaboradores (1989) demostraron que la SP-A inducía un aumento de 5-6°C en la temperatura de transición de fase de vesículas de DPPC/DPPG (7:3, en peso) sin cambio en la entalpía de la transición de fase, lo que sugiere que fuerzas de tipo electrostático están implicadas en la interacción. Por otra parte, Kuroki y AKino (1991) observaron que la SP-A se une en mayor medida a DPPC que a PC de huevo inmovilizados sobre silicagel. Teniendo en cuenta que las cadenas de acilo de los fosfolípidos adsorbidos a la silicagel no están enterradas en el interior de una bicapa, los autores concluyen que la SP-A podría reconocer de manera específica las cadenas de acilo saturadas. En realidad, no se conoce el estado físico de los fosfolípidos inmovilizados en una matriz de silicagel. Nosotros pensamos que es posible que los fosfolípidos formen agregados tales como monocapas o bandas de monocapas, de manera que la cabeza polar de los fosfolípidos estaría interaccionando con la silicagel. Considerando esta hipótesis, parece probable que la DPPC forme agregados altamente ordenados adsorbidos a la matriz de silicagel. Sin embargo, no ocurriría así con la PC de huevo debido a las cadenas de acilo insaturadas y falta de uniformidad en el área molecular que cada molécula de fosfolípido ocupa. El empaquetamiento de los fosfolípidos en agregados lipídicos impone ciertas constricciones en la conformación del fosfolípido que incluye la cabeza polar y el esqueleto carbonado del glicerol. Nuestra hipótesis es que la SP-A podría reconocer una conformación específica del conjunto cabeza polar/esqueleto carbonado del glicerol, propia de agregados altamente ordenados de DPPC. De tal forma, la SP-A no sería capaz de reconocer agregados de PC de huevo al presentar una conformación diferente del conjunto cabeza polar/glicerol. Esta es una interpretación alternativa de los resultados de Kuroki y Akino que nos permite explicar por qué la SP-A no es capaz de unirse al ácido palmítico inmovilizado en matrices de silicagel y, además, presentar nuestra hipótesis de que la SP-A reconoce específicamente la región cabeza polar/esqueleto del glicerol de las vesículas lipídicas, sin que sea necesaria la penetración de la SP-A en la bicapa. De hecho, no hay datos experimentales en la

bibliografía que demuestren o apoyen la hipótesis de que la interacción fosfolípido/SP-A es de naturaleza hidrofóbica.

#### 4.3.6. SUMARIO

La interacción de la SP-A con vesículas de DPPC produce un incremento en la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A, sin que se modifiquen las posiciones de los máximos de emisión de fluorescencia de la proteína. Asimismo, como consecuencia de la interacción de la SP-A con estas vesículas, los fluoróforos de la proteína están más protegidos frente al apagamiento por acrilamida. Los resultados pueden explicarse como consecuencia de un cambio conformacional en la SP-A inducido por la interacción de la proteína con estas vesículas, que disminuye el apagamiento de la fluorescencia de los triptófanos de la SP-A por grupos polarizables de la propia proteína, o del solvente, y hace que los residuos de triptófano sean menos accesibles a la acrilamida. La interacción de distintas clases de fosfolípidos con la SP-A porcina y humana procedente de pacientes con proteinosis alveolar, produce efectos cualitativamente semejantes, pero cuantitativamente distintos: los cambios observados en la fluorescencia intrínseca de la SP-A porcina y humana son mayores en presencia de vesículas de DPPC que en presencia de DPPG, DPPC/DPPG (7:3, en peso) y 1-palmitoil-LPC. La intensidad de emisión de fluorescencia intrínseca de la SP-A no se modifica en presencia de vesículas de PC de huevo. De igual modo, los fluoróforos de la SP-A de cerdo están más protegidos frente al apagamiento por acrilamida en presencia de vesículas de DPPC que en presencia de vesículas de DPPG o LPC. En el caso de la SP-A humana sólo se observa protección de los triptófanos de la SP-A frente al apagamiento por acrilamida tras la interacción de la SP-A con vesículas de DPPC. De acuerdo con estos resultados, parece claro que la interacción de la SP-A con vesículas de DPPC es mayor que con otros fosfolípidos.

La presencia de fuerza iónica fisiológica parece ser un requisito para la interacción de la SP-A con los fosfolípidos; la interacción con la DPPC se reduce en ausencia de NaCl y la presencia de fuerza iónica fisiológica es imprescindible para la interacción de la SP-A con vesículas cargadas negativamente como DPPG o DPPC/DPPG (7:3, en peso). La ausencia de interacción entre la proteína y las vesículas ácidas a baja fuerza iónica podría

deberse a la repulsión electrostática entre la carga negativa de los fosfolípidos y la carga superficial de la SP-A debida a los grupos carboxilo.

El incremento observado en la intensidad de emisión de fluorescencia de la SP-A en presencia de vesículas de DPPC depende del estado físico de estas vesículas. El incremento en la fluorescencia intrínseca de la SP-A es mucho mayor cuando las vesículas se encuentran en el estado gel que cuando están en el estado líquido-cristalino. Estos resultados indican que la interacción de la SP-A con vesículas de fosfolípidos requiere que los lípidos se encuentren en estado cristalino.

La interacción preferencial de la SP-A con DPPC podría ser importante en el ciclo metabólico del surfactante. En primer lugar, la SP-A podría dirigir los fosfolípidos, y preferencialmente la DPPC, hacia los cuerpos lamelares, que están enriquecidos en este fosfolípido disaturado en comparación con otros orgánulos subcelulares de los neumocitos tipo II (Schlame et al., 1988). De esta manera, a fuerza iónica fisiológica, la SP-A interaccionaría fuertemente con la DPPC, y ambos podrían seguir la misma ruta intracelular hasta ser secretados, o la misma ruta de procesamiento intracelular después de ser recapturados por los neumocitos tipo II.

En segundo lugar, la interacción selectiva de la SP-A con DPPC podría ser importante en la generación de una monocapa enriquecida en DPPC en la interfase aire-líquido durante el proceso de adsorción. Schürch y colaboradores (1992) han observado que vesículas de fosfolípidos de composición semejante al surfactante pulmonar, incubadas en presencia de SP-A se comportan de manera similar a monocapas de DPPC pura tras varios ciclos de compresión y expansión de la monocapa "in vitro". Estos resultados, junto con los estudios de selectividad de la SP-A hacia la DPPC, soportan la hipótesis de que la SP-A podría estar implicada en la generación de una monocapa enriquecida en DPPC, esencial para evitar la existencia de altas presiones intraalveolares, y por tanto para prevenir el colapso alveolar

#### **4.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SP-A SOBRE LOS LIPIDOS. AGREGACION DE VESICULAS LIPIDICAS INDUCIDA POR LA SP-A**

##### **4.4.1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS**

La agregación de vesículas lipídicas inducida por la SP-A, dependiente de calcio se ha observado por microscopía electrónica (Haagsman et al., 1991; Williams et al., 1991) y ha sido ensayada por diversos autores mediante cambios de turbidez de una suspensión de vesículas fosfolipídicas unilamelares (Hawgood et al., 1985; Efrati et al., 1987; Haagsman et al., 1990, 1991; Ross et al., 1991). El ensayo de la agregación de vesículas de fosfolípidos inducida por la SP-A se viene utilizando tradicionalmente para ensayar la actividad biológica de la SP-A. Es el único ensayo de actividad biológica de que se dispone. Se sabe que dicha actividad de agregación de vesículas depende del mantenimiento de la estructura nativa oligomérica de la SP-A. La digestión del dominio de colágeno de la SP-A mediante tratamiento con collagenasa bacteriana (Haagsman et al., 1989; Ross et al., 1991) o la reducción y alquilación de la proteína (Ross et al., 1991) anulan el proceso de agregación de vesículas mediado por la SP-A. Esto es, presumiblemente, debido a una disminución de la interacción lípido/SP-A bajo estas condiciones, ya que se ha demostrado que la digestión con collagenasa bacteriana o la reducción de puentes disulfuro con ditioneitol decrece la unión de la SP-A a los fosfolípidos (Ross et al., 1991; Kuroki y Akino, 1991).

Recientemente, Haagsman y colaboradores (1991) han propuesto que la agregación de vesículas inducida por la SP-A dependiente de calcio podría originarse por la autoagregación de la SP-A, proceso ampliamente estudiado en el apartado 4.2.2. de esta memoria. De esta manera, las vesículas lipídicas unidas a la SP-A agregan debido a la autoagregación de la proteína dependiente de calcio. Además, se ha propuesto que la interacción entre dos

moléculas de SP-A podría ser de tipo lectina: la cadena oligosacárida de una molécula de SP-A interaccionaría con el dominio de unión de carbohidratos de otra molécula de SP-A y viceversa (Haagsman et al., 1991).

La actividad de agregación lipídica de la SP-A se correlaciona hipotéticamente con la participación de esta proteína en importantes procesos implicados en el metabolismo extracelular del surfactante, como son la formación de la mielina tubular y la transferencia de la DPPC desde la subfase acuosa del alveolo a la interfase aire-líquido donde este fosfolípido ejerce su actividad tensoactiva.

Teniendo en cuenta la importancia de este proceso, **el primer objetivo de este apartado ha sido estudiar detalladamente los parámetros que gobiernan el proceso de agregación lipídica como son i) el requerimiento de calcio, ii) la influencia de la fuerza iónica y del pH del medio, iii) la dependencia del estado físico de las vesículas fosfolipídicas y ii) la relación fosfolípido/SP-A a la cual se alcanza la máxima agregación lipídica.** El estudio detallado de este proceso no se ha llevado a cabo con anterioridad por otros grupos de investigación. **El segundo objetivo planteado ha sido tratar de dilucidar si realmente la agregación de vesículas inducida por la SP-A es una consecuencia de la autoagregación de esta proteína en presencia de calcio, o si, por el contrario, son procesos independientes.** Sobre la base de los resultados obtenidos, proponemos un posible mecanismo mediante el cual podría ocurrir el proceso de agregación de vesículas inducido por la SP-A, y su importancia en el ciclo metabólico del surfactante.

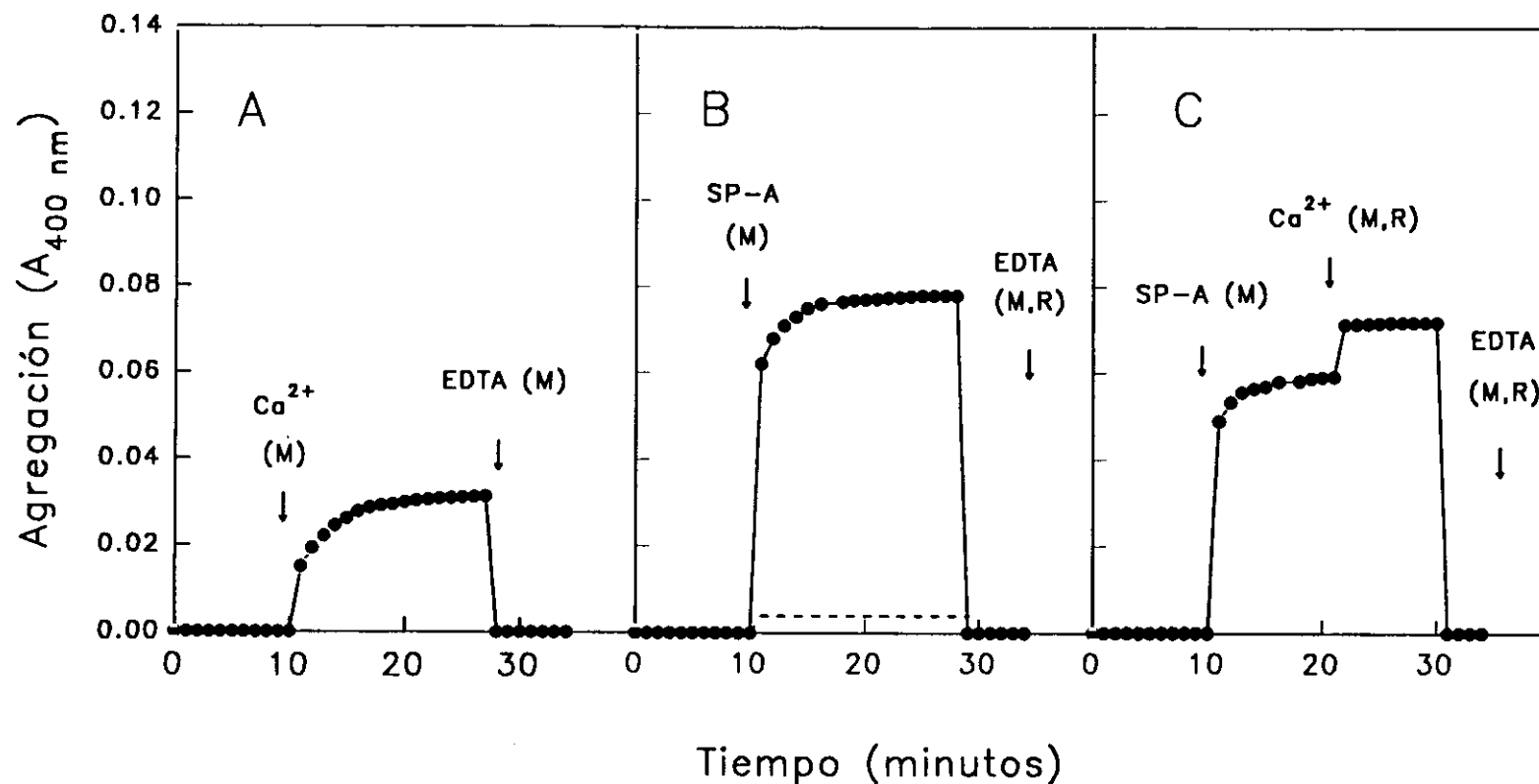
#### **4.4.2. ESTUDIO DE LA AGREGACION DE VESICULAS LIPIDICAS INDUCIDA POR LA SP-A**

En la fase inicial del estudio de la agregación lipídica inducida por la SP-A de cerdo se utilizaron ensayos de agregación empleados previamente por otros investigadores (Hawgood et al., 1985; Efrati et al., 1987; Haagsman et al., 1990, 1991) para comparar la actividad de agregación lipídica de la SP-A de cerdo con la publicada para la SP-A de otras especies. Los estudios de agregación lipídica se han realizado tradicionalmente con vesículas ácidas de DPPC/PG de huevo (7:3, en peso), y éstas son las vesículas utilizadas en la primera parte del trabajo. Los experimentos de agregación se han realizado de acuerdo con

las condiciones descritas en la bibliografía, y los resultados se recogen en la Figura 54 A. En las cubetas de muestra y referencia se añade inicialmente SP-A y vesículas fosfolipídicas en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 150 mM. La agregación se inicia tras la adición de  $\text{CaCl}_2$  5 mM en la cubeta de muestra. La adición de calcio a las vesículas fosfolipídicas en presencia de SP-A de cerdo produce un incremento de absorbancia dependiente del tiempo que es mucho mayor que el observado en experimentos paralelos realizados en ausencia de SP-A. El proceso es perfectamente reversible, tras la adición de EDTA 10 mM, lo que sugiere que no se produce fusión de las vesículas agregadas en las condiciones experimentales utilizadas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (Hawgood et al., 1985; Efrati et al., 1987; Haagsman et al., 1990, 1991). Mediante este tipo de aproximación experimental sólo se registra la agregación inducida por calcio en presencia de SP-A y además no se puede descontar la agregación de vesículas ácidas independiente de SP-A que se produce en presencia de calcio 5  $\mu\text{M}$ .

La Figura 54 B recoge otro tipo de ensayo para estudiar la agregación de vesículas inducida por SP-A en presencia de calcio. En este tipo de experimento las vesículas lipídicas se añaden a las cubetas de muestra y referencia en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 150 mM y  $\text{CaCl}_2$  5 mM. La adición de SP-A a la cubeta de muestra desencadena la agregación de vesículas en presencia de calcio. El agregado se disocia al adicionar EDTA 10 mM en las cubetas de muestra y referencia. Es interesante observar que el incremento de absorbancia ocasionado al añadir SP-A (Figura 54 B) es mucho mayor que el causado al añadir calcio en el experimento de la Figura 54 A. Esta diferencia no se debe al incremento de absorbancia que podría producirse como consecuencia de la autoagregación de la SP-A subsiguiente a la adición de la proteína en un medio que contiene  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que la absorbancia de los agregados de SP-A es muy baja en ausencia de lípidos (Figura 54 B). Podría ocurrir que el efecto que produce la SP-A sobre vesículas ácidas previamente agregadas al estar en presencia de calcio 5 mM (Figura 54 B) sea distinto al que produce el calcio sobre la SP-A asociada a lípidos (Figura 54 A). Dicha asociación parece ser independiente de calcio (King et al., 1983).

Finalmente se ha llevado a cabo un tercer tipo de aproximación experimental (Figura 54 C) en la que se añaden inicialmente en las cubetas de muestra y referencia vesículas lipídicas en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 150 mM. A continuación se añade SP-A en la cubeta de muestra y, sorprendentemente, se produce un importante



**FIGURA 54. Agregación de vesículas de DPPC/PG inducida por la SP-A de cerdo.**

A) Las vesículas (DPPC/DPPG, 7:3, en peso) se añadieron junto con la SP-A en las vesículas de muestra y referencia, en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 150 mM. Tras 10 minutos se adicionó  $\text{CaCl}_2$  en la cubeta de muestra. La agregación se revirtió mediante adición de EDTA en la cubeta de muestra. B) Las vesículas se añadieron en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4  $\text{CaCl}_2$  5 mM, en ausencia de SP-A. Tras 10 minutos se añadió la SP-A en la cubeta de muestra. La agregación se revirtió mediante la adición de EDTA en las cubetas de muestra y referencia. Las líneas de trazo discontinuo corresponden a la autoagregación de la SP-A, a la misma concentración, en presencia de calcio C) Las vesículas se añadieron en las cubetas de muestra y referencia en tampón Tris-HCl 5 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4. Con intervalos de tiempo de 10 minutos se añadió la SPA (cubeta de muestra),  $\text{CaCl}_2$  (cubetas de muestra y referencia) y EDTA (cubetas de muestra y referencia). Las concentraciones de vesículas, SP-A, calcio y EDTA fueron 100  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 5 mM y 10 mM, respectivamente.

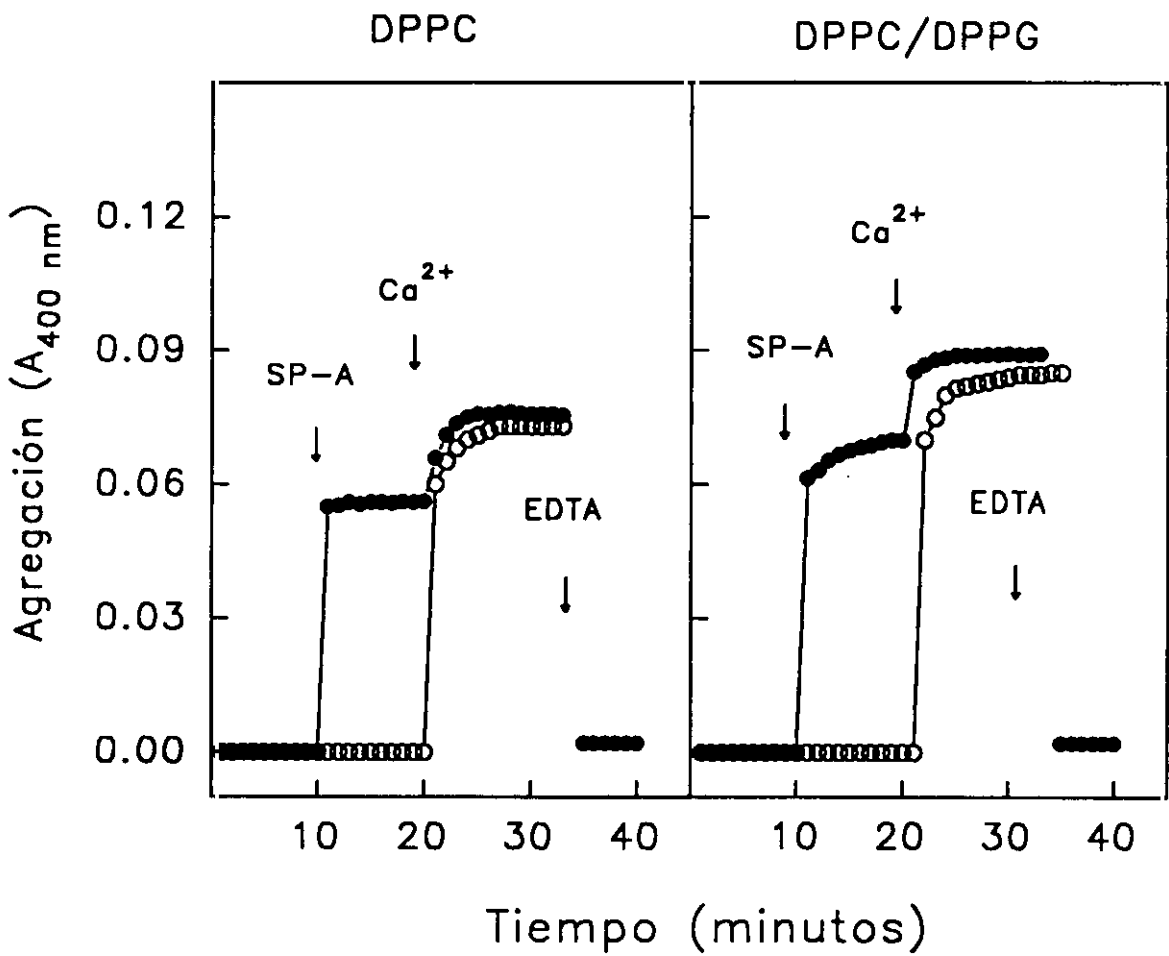


incremento de absorbancia dependiente del tiempo. La máxima agregación se obtiene al añadir  $\text{Ca}^{2+}$ . El calcio se añade en ambas cubetas, muestra y referencia, para descontar el efecto de la agregación lipídica inducida por calcio e independiente de SP-A. Según los resultados de la Figura 54 C, se podría pensar que hay agregación de vesículas inducida por SP-A en ausencia de calcio. Sin embargo, la adición de EDTA disocia el agregado completamente. El cambio de absorbancia que se produce en el experimento A al adicionar calcio 5 mM es semejante al que se puede observar en el experimento tipo C al adicionar este catión en concentraciones milimolares. En experimentos posteriores utilizaremos el ensayo de agregación que se recoge en la Figura 54 C, en vez del que se venía utilizando tradicionalmente (Figura 54 A).

#### 4.4.3. REQUERIMIENTO DE CALCIO

La siguiente pregunta planteada es cuál es la concentración de calcio que se requiere para que se produzca la agregación lipídica inducida por la SP-A. En la Figura 55 se observa la agregación de vesículas neutras y ácidas inducidas por la SP-A en presencia y ausencia de EDTA. La adición de EDTA 1 mM en el tampón de ensayo impide la agregación de ambos tipos de vesículas al añadir SP-A. La agregación sólo ocurre tras la posterior adición de calcio 5 mM. Estos resultados sugieren que para que se produzca la agregación de vesículas inducida por SP-A es suficiente la concentración de calcio que pueda haber en el agua destilada. Se ha valorado la concentración de calcio en el agua destilada Mili-Q utilizada para preparar los tampones mediante espectroscopía de absorción atómica. Los resultados obtenidos indican que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el agua destilada es 5  $\mu\text{M}$ . Esta concentración de calcio es suficiente para que se produzca la agregación de vesículas lipídicas inducida por la SP-A.

La agregación máxima se alcanza, tanto para las vesículas ácidas como para las neutras, en presencia de calcio en concentraciones milimolares. Por tanto, se puede descartar la idea de que el incremento de absorbancia que se produce tras adicionar calcio 5 mM se deba a interacciones lípido-lípido, mediadas por calcio, de los agregados lípido/SP-A formados previamente, ya que sería de esperar que esto ocurriera con vesículas ácidas, pero no con neutras.

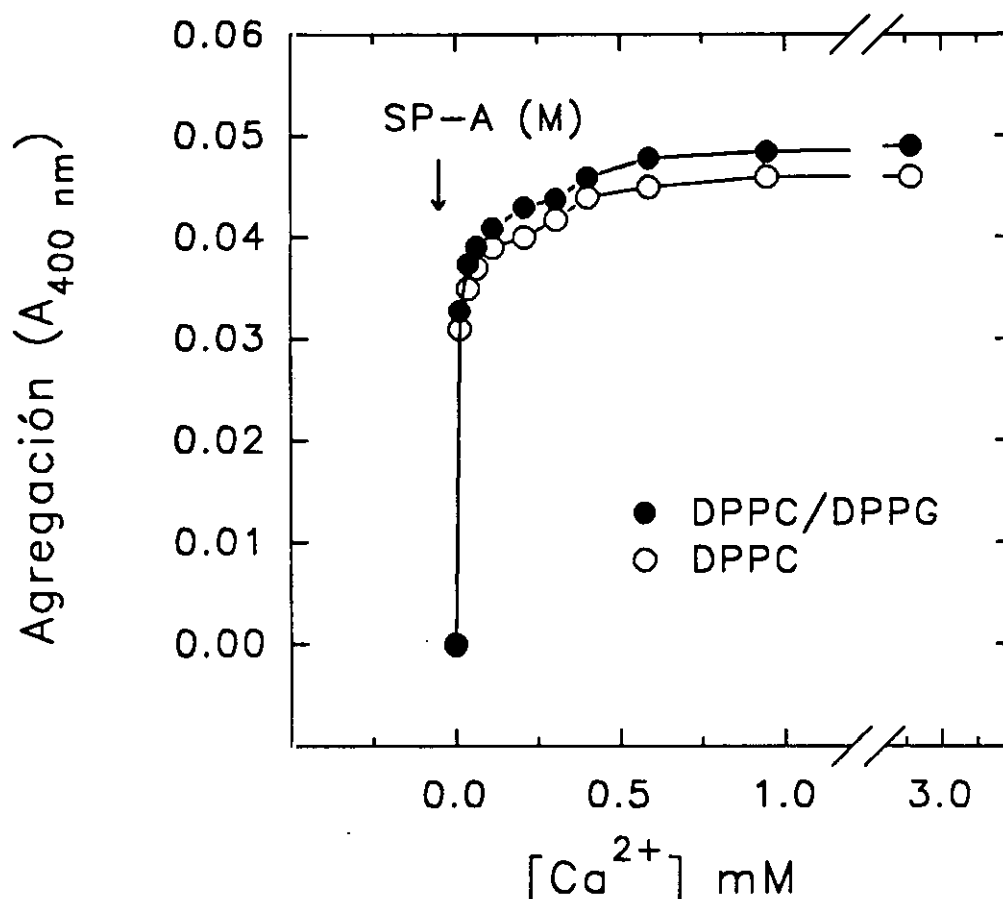


**FIGURA 55.** Agregación de vesículas fosfolipídicas inducida por SP-A en presencia y ausencia de EDTA.

Las vesículas se añaden en las cubetas de muestra y referencia en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 150 mM, en presencia (círculos vacíos) o ausencia (círculos llenos) de EDTA 1 mM. La SP-A se añadió en la cubeta de muestra a una concentración 5  $\mu$ M. Tras 10 minutos se adicionó calcio en las cubetas de muestra y referencia. Transcurridos otros 10 minutos se añadió EDTA en las cubetas de muestra y referencia. Las concentraciones de calcio y EDTA fueron 5 y 16 mM, respectivamente.

En la Figura 56 se representa la agregación de vesículas ácidas y neutras inducida por la SP-A de cerdo a distintas concentraciones de calcio. La agregación de vesículas se desencadena a concentraciones de calcio menores que 5  $\mu$ M. La máxima agregación se

produce a concentraciones de calcio del orden de 0.5 mM. Concentraciones de calcio superiores no producen incrementos en el valor de absorbancia.



**FIGURA 56.** Requerimiento de calcio para la agregación de vesículas de DPPC y DPPC/DPPG inducida por la SP-A.

Las vesículas se añaden en las cubetas de muestra y referencia en Tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 que contiene NaCl 150 mM. Tras 10 minutos, se añade la SP-A en la cubeta de muestra. Tras estabilizarse la señal de absorbancia se añaden sucesivas alícuotas de  $Cl_2Ca$  con intervalos entre ellas de 7 minutos. Se representa el valor de absorbancia a los 6 minutos de añadir el calcio. las concentraciones de SP-A y vesículas de fosfolípidos son 5  $\mu\text{g/ml}$  y 70  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

Nuestros resultados contrastan con los publicados por otros autores. Efrati et al. (1987) observaron que la agregación de liposomas formados a partir de extractos orgánicos

del surfactante no se produce a concentraciones de calcio inferiores a 0.5 mM. En ausencia de SP-A, y en sus condiciones experimentales, la agregación de liposomas requiere concentraciones de calcio del orden de 10 mM. Por otra parte, Ross et al. (1991) publicaron que la agregación de vesículas ácidas, inducida por SP-A no se produce a concentraciones de calcio inferiores a 3 mM, alcanzándose un valor máximo cuando la concentración es de 5 mM. Estos autores incluyeron en el tampón de ensayo EGTA 0.1 mM, y no indicaban la utilización de ningún método de determinación de la concentración de calcio libre en el medio.

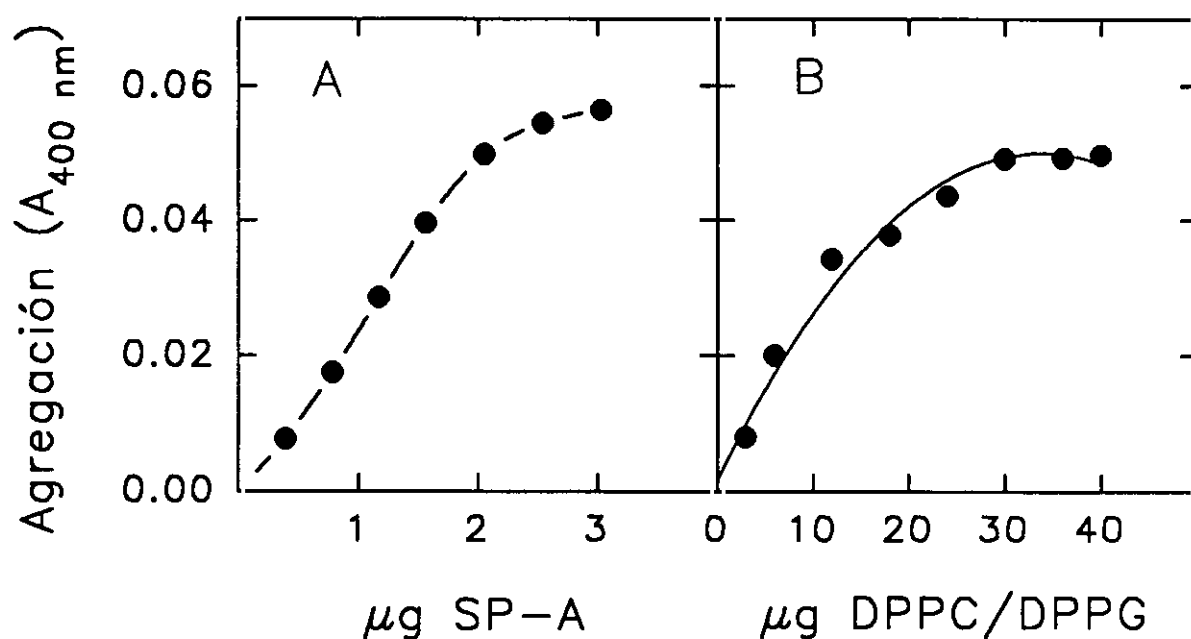
Es interesante resaltar el hecho de que el proceso de autoagregación de la SP-A requiere concentraciones de calcio superiores a 0.5 mM, y alcanza un valor máximo cuando la concentración de calcio en el medio es superior a 5 mM (Apartado 4.2.2., Figura 21). Nuestros resultados indican que mientras que la agregación de vesículas inducida por SP-A comienza a concentraciones de calcio inferiores a 5  $\mu\text{M}$  y alcanza un valor máximo a 0.5 mM, la autoagregación de la SP-A requiere una concentración mínima de 0.5 mM y alcanza un valor máximo en presencia de calcio 8 mM. Estos resultados contradicen la hipótesis propuesta por Haagsman et al. (1990) de que la agregación de vesículas inducida por la SP-A se produce como consecuencia de la autoagregación de la SP-A unida a lípidos, ya que ambos procesos requieren la presencia de iones de calcio a concentraciones muy diferentes.

Los estudios de unión de calcio a la SP-A, realizados mediante ensayos de diálisis de equilibrio y cromatografía de penetrabilidad (Haagsman et al., 1990) se ajustan a un modelo en el que la SP-A tendría dos tipos de sitios de unión, con diferentes afinidades. Las constantes de disociación estimadas fueron  $11 \pm 15 \mu\text{M}^{-1}$  y  $0.7 \pm 0.3 \mu\text{M}^{-1}$  para los sitios de alta y baja afinidad, respectivamente. Nuestros resultados sugieren que la unión de calcio al sitio de alta afinidad desencadena un cambio conformacional (Apartado 4.2) necesario para que se desencadene la agregación de vesículas inducida por la SP-A.

#### 4.4.4. RELACION LIPIDO/PROTEINA SATURANTE

La siguiente pregunta planteada es cuál es la relación lípido-proteína a la que se produce la máxima agregación de vesículas. Los experimentos se han realizado manteniendo constante la concentración de vesículas e incrementando la cantidad de SP-A (Figura 57 A)

o bien manteniendo constante la concentración de proteína y modificando la concentración de vesículas (Figura 57 B). En ambos casos los ensayos se han realizado en presencia de NaCl 150 mM y en ausencia de calcio milimolar.



**FIGURA 57. Relación lípido/proteína a la que se produce la máxima agregación de vesículas de DPPC/DPPG inducida por la SP-A.**

A) Las vesículas se añaden en las cubetas de muestra y referencia en tampón Tris-ClH 5mM, pH 7.4 que contiene NaCl 150 mM. La concentración de las vesículas es de 100  $\mu\text{g/ml}$ . Tras 10 minutos se añaden alícuotas de SP-A, con intervalos entre adiciones sucesivas de 7 minutos. B) Se añade la SP-A en las cubetas de muestra y referencia en tampón Tris-ClH 5 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 150 mM. La concentración de SP-A fue 5.65  $\mu\text{g/ml}$ . Tras 10 minutos se añaden las alícuotas de lípidos con intervalos entre ellas de 7 minutos. Se representa el valor de absorbancia a los 6 minutos de añadir la SP-A o los lípidos.

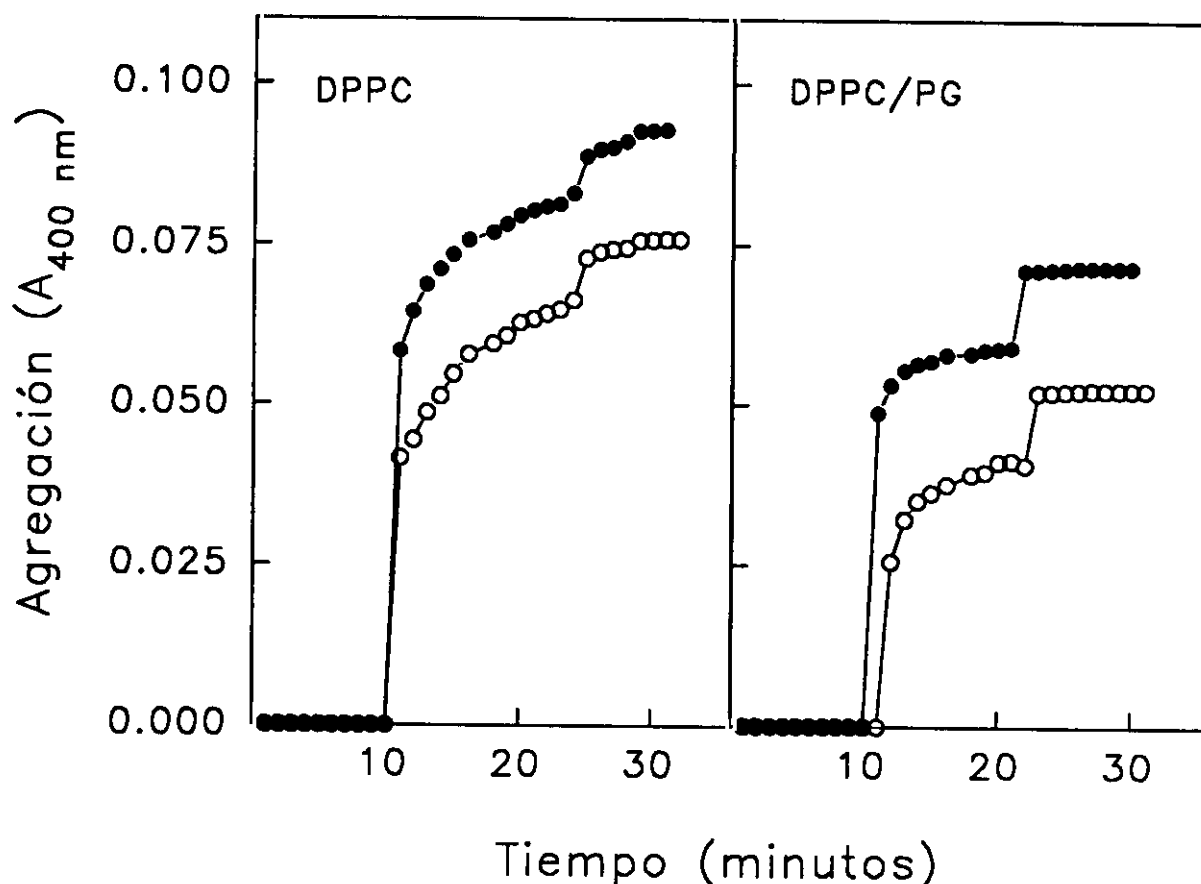
Tras la titulación de la SP-A de cerdo con vesículas de DPPC/DPPG (7:3, en peso) se obtiene una curva hiperbólica (Figura 57 B) que alcanza la saturación a una relación lípido/proteína en torno a 10:1-13:1 (en peso), relación semejante a la de la titulación inversa (Figura 57 A). Estos valores son ligeramente superiores a los obtenidos por King y Mc Beth (1981) para la unión de SP-A canina a vesículas de DPPC, DPPC/DPPG/POPG/Ch (63:9:19:9, en peso), y que mostraban una relación lípido/proteína saturante en torno a 5:1-

7:1 (en peso). Los ensayos de unión realizados por estos autores se han desarrollado incubando mezclas de  $^{125}\text{I}$ -SP-A y vesículas lipídicas marcadas con  $^{14}\text{C}$ , y separando los complejos lipoproteicos de la SP-A y los lípidos libres mediante centrifugación en gradiente de densidad. Cuando los ensayos se realizan en presencia de calcio 3 mM, se incrementa la relación lípido/proteína de las vesículas ácidas hasta valores en torno a 25: 1 (en peso). La cantidad de SP-A que se asocia con los lípidos es independiente de la presencia de calcio (King et al., 1983), por lo que la modificación de la estequiometría de los complejos lípido/proteína podría deberse a interacciones lípido-lípido mediadas por calcio. Teniendo en cuenta la relación lípido/proteína a la que se alcanza la máxima actividad de agregación de vesículas inducida por la SP-A, la relación lípido-proteína fijada para otros estudios de agregación lipídica inducida por la SP-A ha sido de 14:1.

#### 4.4.5. REQUERIMIENTO DE LAS CADENAS OLIGOSACARIDAS

La cadena de azúcares de la SP-A, así como sus propiedades de tipo lectina, parecen implicadas en las funciones de defensa que desarrolla la SP-A en el alveolo (Van Iwaarden et al., 1992 c; Zimmerman et al., 1992) de modo semejante a otras proteínas de la familia de las colectinas (Sastry y Ezekowitz, 1993). Por otra parte, se cree que el dominio de reconocimiento de carbohidratos podría tener importancia como señal que dirige a la proteína en su tráfico intracelular (Whitsett et al., 1985; O'Reilly et al., 1988; Alcorn et al., 1993). No se conoce todavía el requerimiento de las cadenas oligosacáridas para la ejecución de otras funciones de la SP-A (inhibición de la secreción del surfactante, formación de mielina tubular, etc.). Tampoco está claro el requerimiento del dominio de unión de carbohidratos y de las cadenas de oligosacáridas de la SP-A para la actividad de agregación de vesículas. Haagsman y colaboradores (1991) demostraron que la actividad de agregación de vesículas de la SP-A disminuye drásticamente cuando la proteína se encuentra desglicosilada. Los ensayos de agregación lipídica dependiente de SP-A realizados por estos autores se ajustan al modelo representado en la Figura 54 A. Por tanto, los estudios se basan en la inducción de la agregación de fosfolípidos unidos a SP-A por adición de calcio 5 mM. La interpretación que hacen estos autores de sus resultados es que la agregación de vesículas es un proceso dependiente de la autoagregación de la SP-A, y que este proceso de autoagregación ocurre mediante la interacción de las cadenas oligosacáridas de una molécula de SP-A con los sitios de unión de carbohidratos de la otra, y viceversa. Este tipo

de interacción de tipo lectina, es dependiente de calcio. La desglicosilación de la SP-A impediría la existencia de este tipo de interacciones, disminuyendo en gran medida la agregación de vesículas de fosfolípidos.



**FIGURA 58. Importancia de las cadenas oligosacáridas de la SP-A en la actividad de agregación de vesículas.**

Las vesículas se añaden en las cubetas de muestra y referencia en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 150 mM. Tras 10 minutos se añade la SP-A desglicosilada (círculos vacíos) o control (círculos llenos), incubada con todos los componentes de la reacción de desglicosilación, pero sin enzima, en la cubeta de muestra. Posteriormente se añade calcio en las cubetas de muestra y referencia. Las concentraciones de fosfolípidos, SP-A y calcio en el ensayo son 70  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  y 2 mM, respectivamente.

Los estudios de agregación lipídica con SP-A desglicosilada y SP-A control (incubada con todos los componentes de la reacción de desglicosilación, pero sin enzima) se recogen en la Figura 58. Los experimentos se han llevado a cabo con vesículas neutras (DPPC) y ácidas (DPPC/PG, 7:3, en peso). La desglicosilación de la SP-A reduce su actividad de agregación de vesículas fosfolipídicas a concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  micromolares ( $5 \mu\text{M}$ ). La adición de calcio 2 mM incrementa los valores de absorbancia tanto de las muestras con SP-A control como con SP-A desglicosilada. Además, la magnitud del incremento de absorbancia que se produce tras la adición de calcio 2 mM es semejante en ambos casos. La máxima agregación de vesículas inducida por la SP-A desglicosilada es menor que la inducida por la SP-A control (Figura 58).

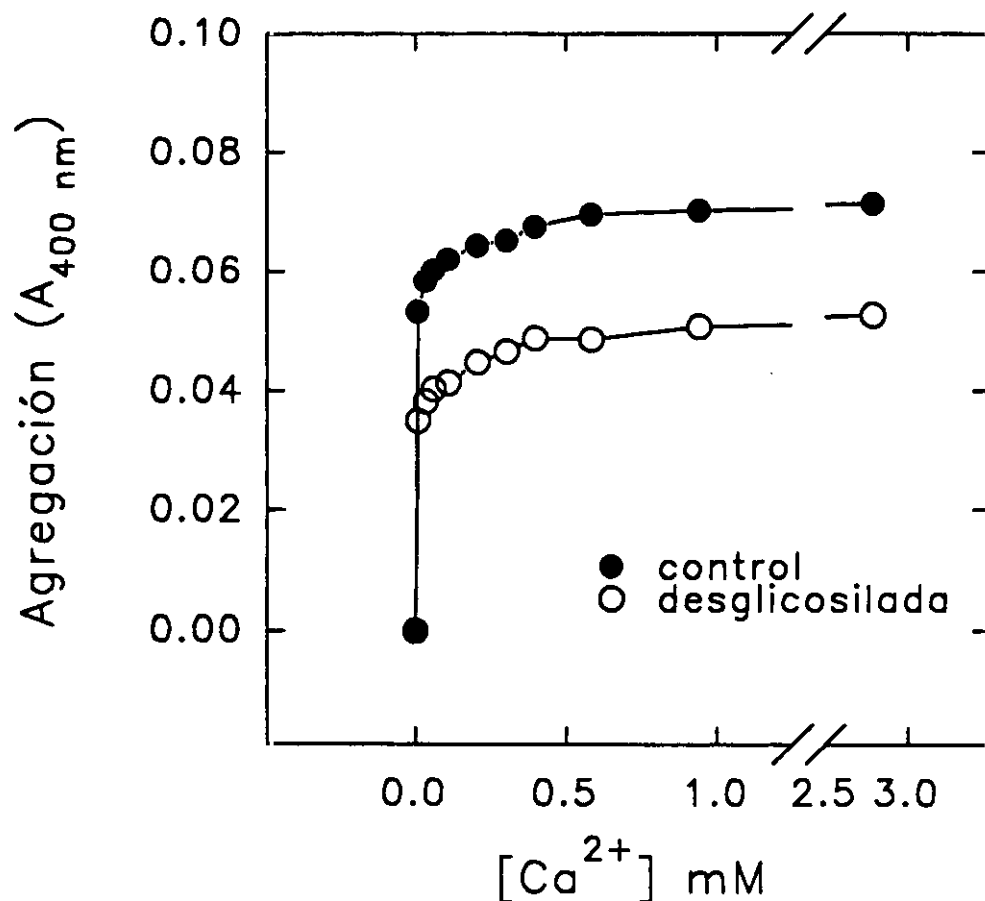
La Figura 59 muestra la actividad de agregación de la SP-A control y desglicosilada en función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se observa que el requerimiento de calcio para la agregación de vesículas es el mismo para la SP-A control que para la desglicosilada, aunque la extensión de la agregación sea superior en la SP-A control, en un 25%

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS de muestras de SP-A control y desglicosilada (Figura 18) muestra una eliminación total de la banda correspondiente a la proteína glicosilada después del tratamiento con la enzima desglicosilante. Es posible que exista una cantidad de proteína glicosilada, que no pueda detectarse por la técnica de tñido con azul de Coomassie. En cualquier caso debe ser una cantidad pequeña, y sería esperable que la actividad de agregación de vesículas residual, inducida por esa posible proteína glicosilada fuese escasa.

Los resultados presentados en las Figuras 58 y 59 muestran que la desglicosilación de la SP-A reduce su capacidad de agregar vesículas, y que el requerimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  del proceso es similar para la SP-A control y la SP-A desglicosilada. Estos resultados podrían indicar que la eliminación de las cadenas oligosacáridas alteraría la estructura de la proteína, disminuyendo su capacidad para agregar vesículas fosfolipídicas. Las cadenas de carbohidratos de la SP-A podrían ser importantes para la adquisición o estabilización de una determinada estructura en la que la SP-A tiene la máxima actividad de agregación de vesículas. De acuerdo con esta interpretación, la agregación de vesículas inducida por la SP-A



sería un proceso no dependiente de la autoagregación de la proteína producida por interacciones lectina-lectina.



**FIGURA 59. Requerimiento de calcio para la agregación de vesículas de DPPC/PG para la SP-A control y desglucosilada.**

Las vesículas se añaden en las cubetas de muestra y referencia en Tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 que contiene NaCl 150 mM. Tras 10 minutos, se añade la SP-A control o desglucosilada en la cubeta de muestra. Tras estabilizarse la señal de absorbancia se añaden sucesivas alícuotas de Cl<sub>2</sub>Ca con intervalos entre ellas de 7 minutos. Se representa el valor de absorbancia a los 6 minutos de añadir el calcio. las concentraciones de SP-A y vesículas de fosfolípidos son 5 µg/ml y 70 µg/ml respectivamente.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, es claro que el proceso de agregación de vesículas inducido por la SP-A no sería dependiente de la autoagregación de la proteína producida por interacciones lectina-lectina, ya que la agregación de vesículas ocurre con la

proteína desglicosilada (Figuras 58 y 59). Tampoco parece probable que el proceso de agregación de vesículas fosfolipídicas unidas a la SP-A dependa de la autoagregación de la proteína en presencia de calcio, ya que la autoagregación de la proteína requiere concentraciones de calcio superiores a 0.5 mM, mientras que el proceso de agregación de vesículas dependiente de SP-A comienza a concentraciones de calcio inferiores a 5  $\mu$ M.

De acuerdo con estos hechos sugerimos el siguiente mecanismo, a través del cual se formarían los agregados lipoproteicos:

La agregación de vesículas se produciría como consecuencia de la unión de éstas a la SP-A. La naturaleza oligomérica de la SP-A permitiría la unión simultánea de más de una vesícula a la proteína, y al mismo tiempo, y debido al tamaño de una vesícula fosfolipídica, ésta podría interactuar con más de una molécula de SP-A. De esa manera se formaría un entramado lipoproteico en cuya formación estarían implicadas interacciones proteína-proteína. La formación de este agregado lipoproteico requiere calcio en concentraciones micromolares. La presencia de EDTA cambia la conformación de la SP-A y disocia el complejo lipoproteico.

Los resultados obtenidos (Figuras 58 y 59) podrían tener otra segunda interpretación, que nos conduciría a establecer una segunda hipótesis sobre el mecanismo de formación de agregados. Es posible que la disminución de la extensión de la agregación que se produce con la proteína desglicosilada con respecto a la proteína control (Figuras 58 y 59) se deba al hecho de que cuando la proteína está desglicosilada, se producen únicamente interacciones proteína-lípido, descritas previamente, mientras que cuando la proteína está glicosilada se podrían producir, además, interacciones proteína-proteína de tipo lectina. Esto es posible si tenemos en cuenta que la unión de azúcares a la SP-A es un proceso dependiente de calcio, produciéndose la unión a partir de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  del orden de 5-10  $\mu$ M, alcanzándose la unión máxima en el rango 0.1-1 mM (Haurum et al., 1993). Esto sugiere que la unión de lípidos a la proteína y las interacciones de tipo lectina se podrían producir simultáneamente, lo que conduciría a un tipo de agregado lipoproteico en el que las interacciones proteína-proteína estarían implicadas en la organización de dicho entramado. El hecho de que disminuya la extensión de la agregación con la proteína desglicosilada podría interpretarse en términos de participación de las interacciones de tipo lectina-lectina

en la organización del agregado. Por otra parte, el hecho de que no se altere el requerimiento de calcio para la agregación de vesículas mediada por la proteína desglicosilada indicaría que ambos procesos -interacciones lectina-lectina- y entrecruzamiento de vesículas de fosfolípidos y SP-A- hipotéticamente implicados en la agregación de vesículas, podrían tener el mismo requerimiento de calcio.

Esta segunda interpretación de los resultados explicaría también los experimentos publicados por Haagsman y colaboradores (1991) en los que observaban que la agregación de vesículas inducida por SP-A se revierte parcialmente al adicionar al medio de ensayo el fragmento resistente a colagenasa (añadido 10 veces en exceso). Dicho fragmento no une lípidos (Haagsman et al., 1989; Ross et al., 1991), de manera que la disminución de la extensión del agregado debe atribuirse a la disminución de interacciones de tipo lectina entre moléculas de SP-A como consecuencia de la competición con el fragmento. Dicho fragmento actuaría al mismo tiempo como ligando para la SP-A y como lectina que une la cadena oligosacárida de la SP-A.

Para estudiar si la capacidad de la SP-A de unir carbohidratos está implicada en la agregación de vesículas, se diseñaron experimentos en los que el manano, un homopolisacárido de manosa, se utilizó para disociar el agregado. La Figura 60 muestra que la adición de manano, utilizado en exceso, al medio de ensayo en el que se encuentran agregados de vesículas neutras (A) o ácidas (B) con SP-A, causa una disminución de absorbancia que puede ser interpretada como una disminución de la extensión del agregado al romperse interacciones lectina-lectina entre moléculas de SP-A. La disminución que se produce es mayor con vesículas neutras que con vesículas ácidas. Estos resultados podrían deberse a la estabilización por el calcio de los agregados formados por vesículas ácidas, al establecerse interacciones entre fosfolípidos ácidos de vesículas distintas.

De acuerdo con la interpretación anterior de los resultados, sugerimos el siguiente mecanismo de formación de agregados de vesículas mediados por SP-A:

La agregación de vesículas fosfolipídicas se produciría como consecuencia de la unión de vesículas a la SP-A, tal y como se indicó anteriormente. Simultáneamente, se producirían interacciones proteína-proteína, de tipo lectina, que afectarían a la organización tridimensional, y a la extensión del

agregado. La presencia de EDTA disociaría dicho complejo, debido al requerimiento de calcio para la interacción lectina-lectina y el entrecruzamiento de vesículas de fosfolípidos y SP-A.

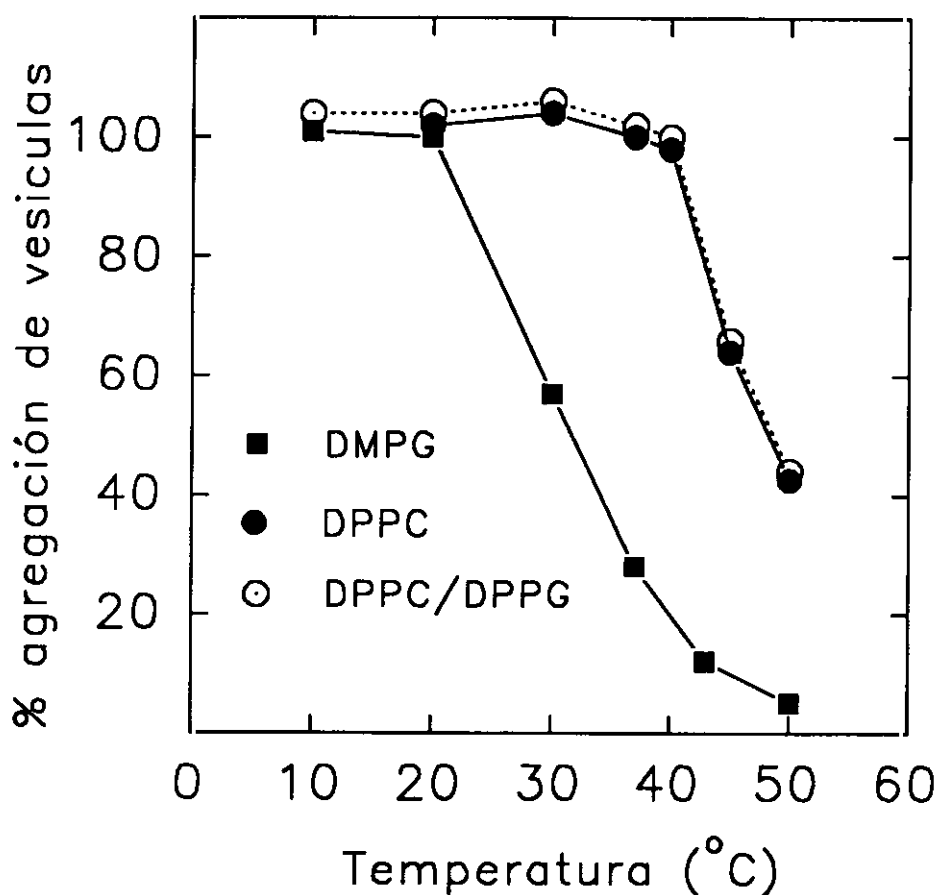
Los resultados que aparecen en esta memoria sugieren que existen dos tipos de interacciones entre moléculas de SP-A: interacciones laterales, en las que estarían implicados los dominios colagénicos y serían independientes de las propiedades de tipo lectina de la SP-A, e interacciones radiales, a través de los dominios globulares y dependientes de las propiedades de tipo lectina. Las propiedades de tipo lectina de la SP-A podrían estar implicadas en la formación de la mielina tubular.

#### **4.4.6. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA AGREGACION DE VESICULAS INDUCIDA POR LA SP-A**

Se ha estudiado también el efecto de la temperatura sobre la agregación de vesículas de fosfolípidos inducida por la SP-A. Se han realizado ensayos en los que se han incubado vesículas de DPPC, DPPC/DPPG (7:3, m/m) y DMPG con SP-A en ausencia de calcio milimolar a distintas temperaturas (Figura 61). El estudio pone de manifiesto que el proceso depende de la temperatura. Se observa que la agregación es mayor a temperaturas por debajo de la temperatura de transición de fase (41° C para las vesículas de DPPC y DPPC/DPPG y de 23° C para las vesículas de DMPG).

De acuerdo con los estudios realizados por otros grupos previamente, no es previsible que se produzca desnaturalización térmica de la SP-A a temperaturas inferiores a 50° C (Haagsman et al., 1989). Para excluir la posibilidad de que la disminución de la agregación se deba a inactivación de la SP-A, en otros experimentos se ha calentado la SP-A a 50° C durante 10 minutos en ausencia de fosfolípidos y se ha comparado la actividad de agregación a 37° C de vesículas de DPPC con la de SP-A control no sometida a calentamiento. En la Figura 62 se observa que la SP-A calentada a 50° C no pierde la capacidad de agregar vesículas de DPPC, lo que sugiere que la inhibición de la agregación no se debe a alteraciones estructurales de la SP-A. Estos resultados muestran que la agregación de vesículas inducida por la SP-A depende del estado físico de las vesículas. La magnitud de la agregación es mayor en el estado gel que en el líquido-cristalino. Mediante estudios de fluorescencia (Figura 53) se ha mostrado que la interacción de los lípidos con la SP-A

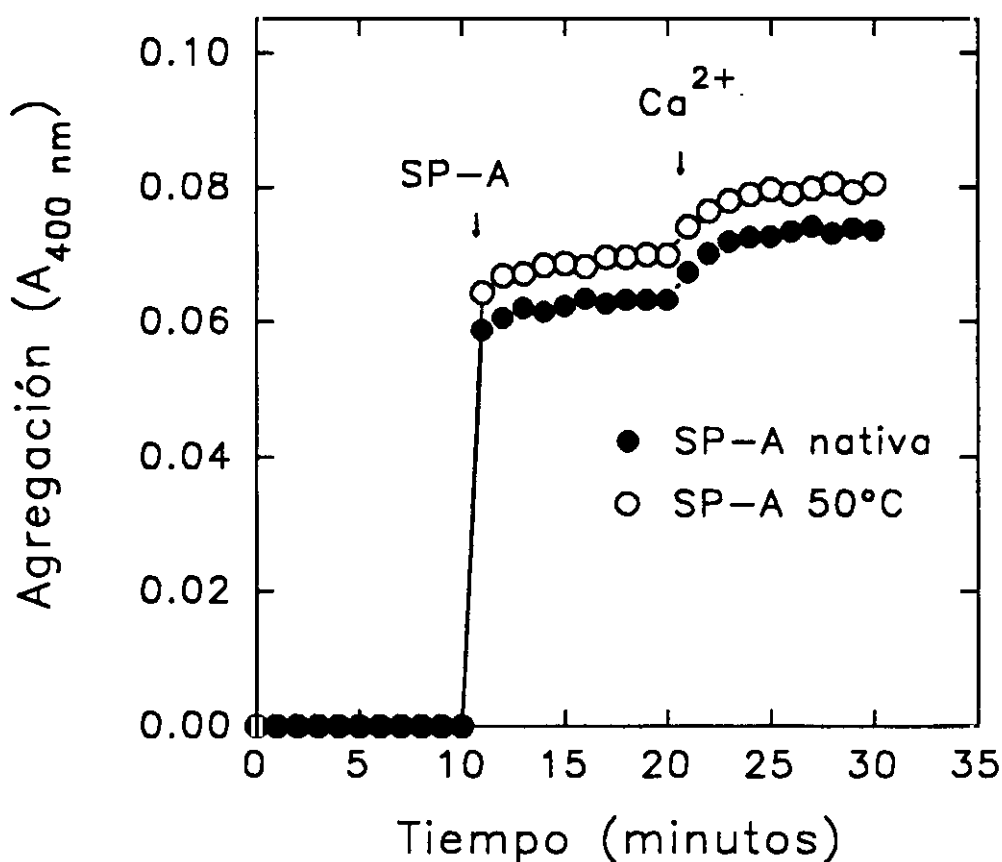
depende asimismo del estado físico de las vesículas. Los resultados de agregación obtenidos probablemente se deban a una menor interacción de los lípidos con la SP-A a temperaturas por encima de la temperatura de transición de fase.



**FIGURA 61. Influencia de la temperatura en la agregación de vesículas de fosfolípidos inducida por la SP-A.**

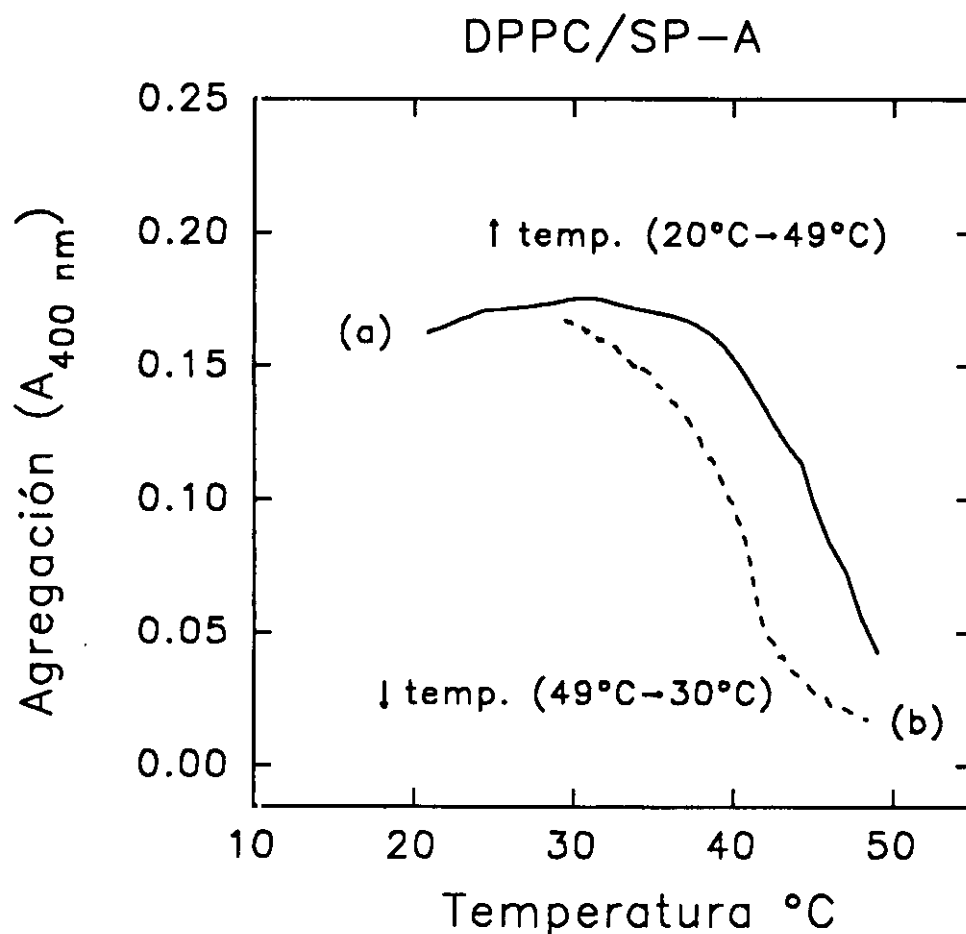
Las vesículas se añaden en las cubetas de muestra y referencia a cada temperatura en tampón Tris-ClH 5 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 150 mM. Tras 10 minutos se añade la SP-A. Se representa el valor de absorbancia obtenido 10 minutos después de adicionar la SP-A. Las concentraciones de SP-A y vesículas son 5 y 70  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

La siguiente pregunta planteada fue si los complejos lipoproteicos formados son estables al elevar la temperatura por encima de la temperatura de transición de fase. Para comprobarlo se incubaron vesículas de DPPC en ausencia de calcio milimolar a 20°C y se elevó la temperatura de una manera continua hasta 49°C (Figura 63). Se observa que los complejos lípido-proteína se disocian al elevar la temperatura por encima de la transición de fase.



**FIGURA 62.** Agregación de vesículas de DPPC inducida por la SP-A nativa y calentada a 50°C durante 10 minutos.

Las vesículas se añaden en las cubetas de muestra y referencia en tampón Tris-HCl, 5 mM pH 7.4, que contienen NaCl 150 mM. Tras 10 minutos se añade en la cubeta de muestra SP-A control o calentada a 50°C durante 10 minutos. Posteriormente se adicionó calcio en las cubetas de muestra y referencia. Las concentraciones de SP-A, fosfolípidos y calcio son 5 µg/ml, 70 µg/ml y 5 mM respectivamente.

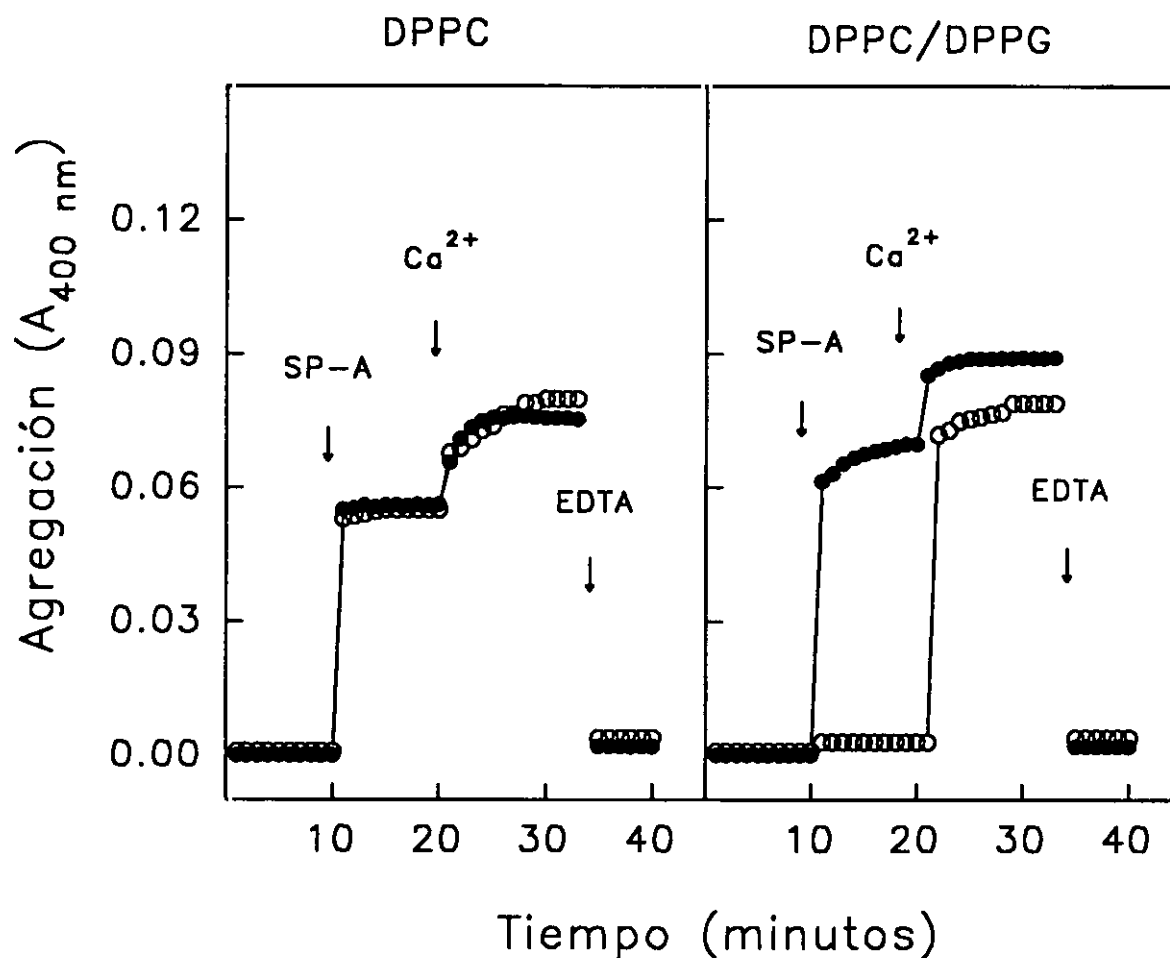


**FIGURA 63. Influencia de la temperatura en la agregación de vesículas de DPPC.**

Las vesículas se añadieron en ausencia de calcio en las cubetas de muestra y referencia en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, que contiene NaCl 150 mM sin SP-A (cubeta de referencia) y con SP-A (cubeta de muestra) a 20°C (a) o a 50°C (b). La temperatura se varió con una velocidad de barrido de 0.5°C/minuto. Las concentraciones de SP-A y DPPC fueron 5 y 70 µg/ml.

También se han realizado experimentos en los que se incuban la SP-A con DPPC a 49°C y se disminuye la temperatura progresivamente (Figura 63). Se observa que la agregación de vesículas es escasa por encima de la temperatura de transición de fase, probablemente debido a la escasa interacción de las vesículas de DPPC con la SP-A. Al disminuir la temperatura se incrementa la agregación lipídica alcanzándose valores de agregación semejantes a los que se producían incubando la mezcla de SP-A y vesículas a

temperaturas por debajo de la temperatura de transición de fase, lo que confirma que la proteína no pierde su capacidad de agregación tras el calentamiento a 49°C, y muestra que el proceso es reversible.



**FIGURA 64.** Efecto de la fuerza iónica en la agregación de vesículas de DPPC y DPPC/DPPG inducida por la SP-A.

Las vesículas de DPPC y DPPC/DPPG (7:3, en peso) se añaden en las cubetas de muestra y referencia en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, en presencia (círculos llenos) o en ausencia (Círculos vacíos) de NaCl 150 mM. Posteriormente se añade la SP-A (cubeta de muestra), calcio (cubetas de muestra y referencia) y EDTA (cubetas de muestra y referencia). Las concentraciones de SP-A, fosfolípidos, calcio y EDTA utilizadas son 5 µg/ml, 70 µg/ml, 5 mM y 16 mM respectivamente.



#### 4.4.7. INFLUENCIA DE LA FUERZA IONICA EN LA AGREGACION DE VESICULAS INDUCIDA POR LA SP-A

Los resultados que aparecen en esta memoria indican que la fuerza iónica modifica algunas propiedades de la SP-A: induce autoagregación de la proteína (Apartado 4.2.2., Figura 22) y permite la interacción de la SP-A con vesículas de fosfolípidos ácidos (Apartado 4.3.3., Figura 50; Apartado 4.3.4., Figura 52). Por tanto, es lógico pensar que puede también influir en la agregación de vesículas inducida por la SP-A. En la Figura 64 se recogen los estudios de agregación de vesículas de DPPC y DPPC/DPPG (7:3, en peso) inducida por la SP-A de cerdo en presencia o ausencia de NaCl 150 mM.

Se puede observar que la SP-A agrega vesículas de fosfolípidos ácidos en presencia, pero no en ausencia de NaCl. Sin embargo, la SP-A sí agrega vesículas de DPPC a baja fuerza iónica. Como se ha discutido previamente (Apartado 4.3.4., Figura 52) la interacción de la SP-A de cerdo y humana con las vesículas de fosfolípidos ácidos se anula en ausencia de NaCl, por lo que la inhibición de la agregación pudiera deberse a una menor unión de estas vesículas a la SP-A a baja fuerza iónica. Los incrementos de absorbancia que se producen para las vesículas de DPPC en presencia y ausencia de NaCl son semejantes. Por tanto, el NaCl no tiene ningún efecto sobre la agregación de vesículas neutras. En el caso de las vesículas ácidas permite la unión de estas vesículas a la SP-A y, por tanto, la agregación de las mismas.

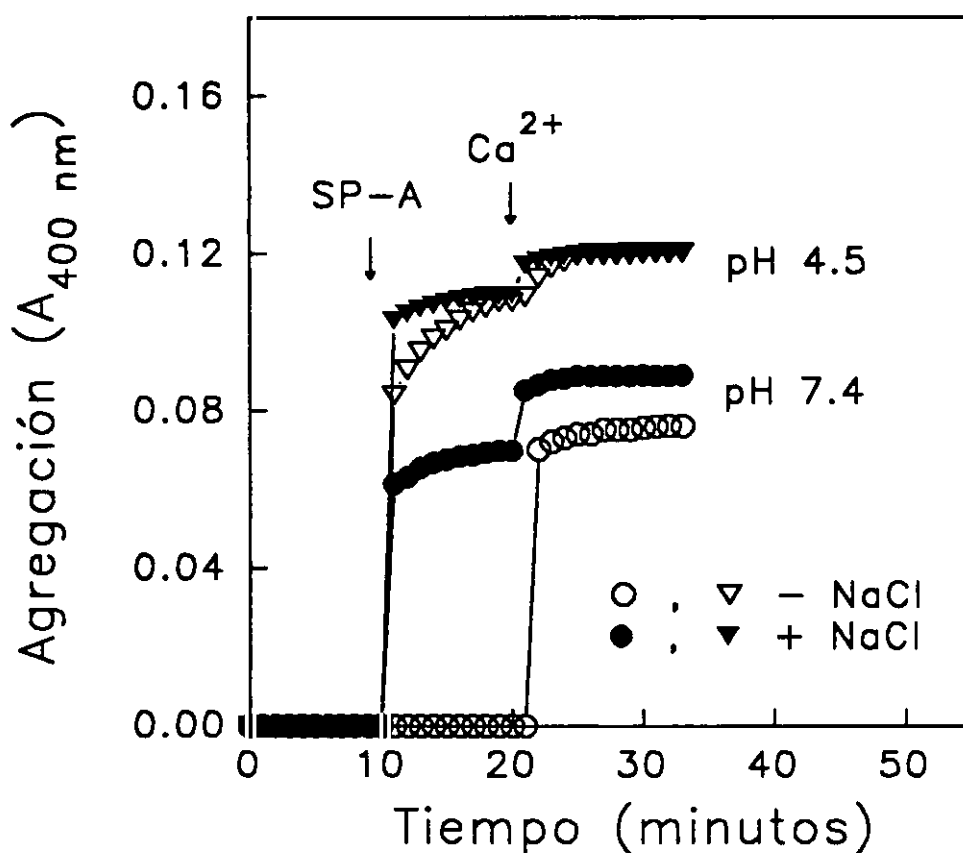
#### 4.4.8. AGREGACION DE VESICULAS A PH ACIDO

La SP-A autoagrega a pH ácido en ausencia de calcio y de fuerza iónica. A pH ácido se observan alteraciones estructurales en la SP-A que se manifiestan en cambios en el espectro de dicroísmo circular y las propiedades fluorescentes de la proteína. Es posible, por tanto, que la acidificación del medio modifique las propiedades de agregación de vesículas de la SP-A. Hasta el momento sólo se ha publicado que la SP-A agrega vesículas constituidas por extractos orgánicos del surfactante que contienen las proteínas hidrofóbicas a pH 4.4 en ausencia de calcio micromolar. La magnitud de la agregación observada por estos autores a pH 4.4 en ausencia de calcio es semejante a la que obtienen a pH 7.4 en presencia de calcio

2 mM. Igualmente estos autores muestran la formación de figuras semejantes a las de mielina tubular obtenidas al incubar muestras de surfactante a pH 4.4 en presencia de EDTA 5 mM (Efrati et al., 1987). De acuerdo con estos resultados, se proponía un modelo en el que el calcio y los protones actuaban, al menos en parte, neutralizando cargas debidas a grupos carboxilo de la SP-A. Los estudios realizados se han centrado en comprobar si la SP-A de cerdo agrega vesículas de lípidos en ausencia de las proteínas hidrofóbicas, y si los protones son capaces de sustituir el efecto provocado por la fuerza iónica o el calcio. En la Figura 65 se compara la agregación de vesículas de DPPC/DPPG (7:3, en peso) a pH 7.4 y pH 4.5 en presencia y ausencia de NaCl. Se observa un mayor incremento de absorbancia a 360 nm, tras la adición de la SP-A a la cubeta de muestra, a pH ácido que a pH neutro. Por otro lado, la SP-A agrega vesículas ácidas a pH 4.5 en ausencia de NaCl a pH ácido, pero no a pH neutro. La máxima agregación se produce tras la adición de calcio milimolar.

En la Figura 66 se muestra que la agregación de vesículas de DPPC y DPPC/DPPG (7:3, en peso) a pH 4.5 no se inhibe en presencia de EDTA 1 mM. Estos resultados coinciden con los de autoagregación que mostraban que la autoasociación de la proteína a pH ácido era independiente de la unión de calcio al sitio de alta afinidad de la proteína, y apoyan la hipótesis de un cambio estructural de la SP-A que modifica las propiedades de agregación de la proteína. Existen dos conformaciones de la SP-A que pueden agregar vesículas de fosfolípidos: una a pH 7.4 en presencia de calcio micromolar y otra a pH ácido en ausencia de calcio. Además el tipo de agregación a pH neutro y ácido es diferente. A pH neutro la magnitud de la agregación es semejante para vesículas de DPPC y DPPC/DPPG (7:3, en peso). Al acidificarse el medio se incrementa la agregación de vesículas ácidas y disminuye considerablemente la agregación de vesículas de DPPC. En ambos casos la máxima agregación se produce en presencia de calcio milimolar.

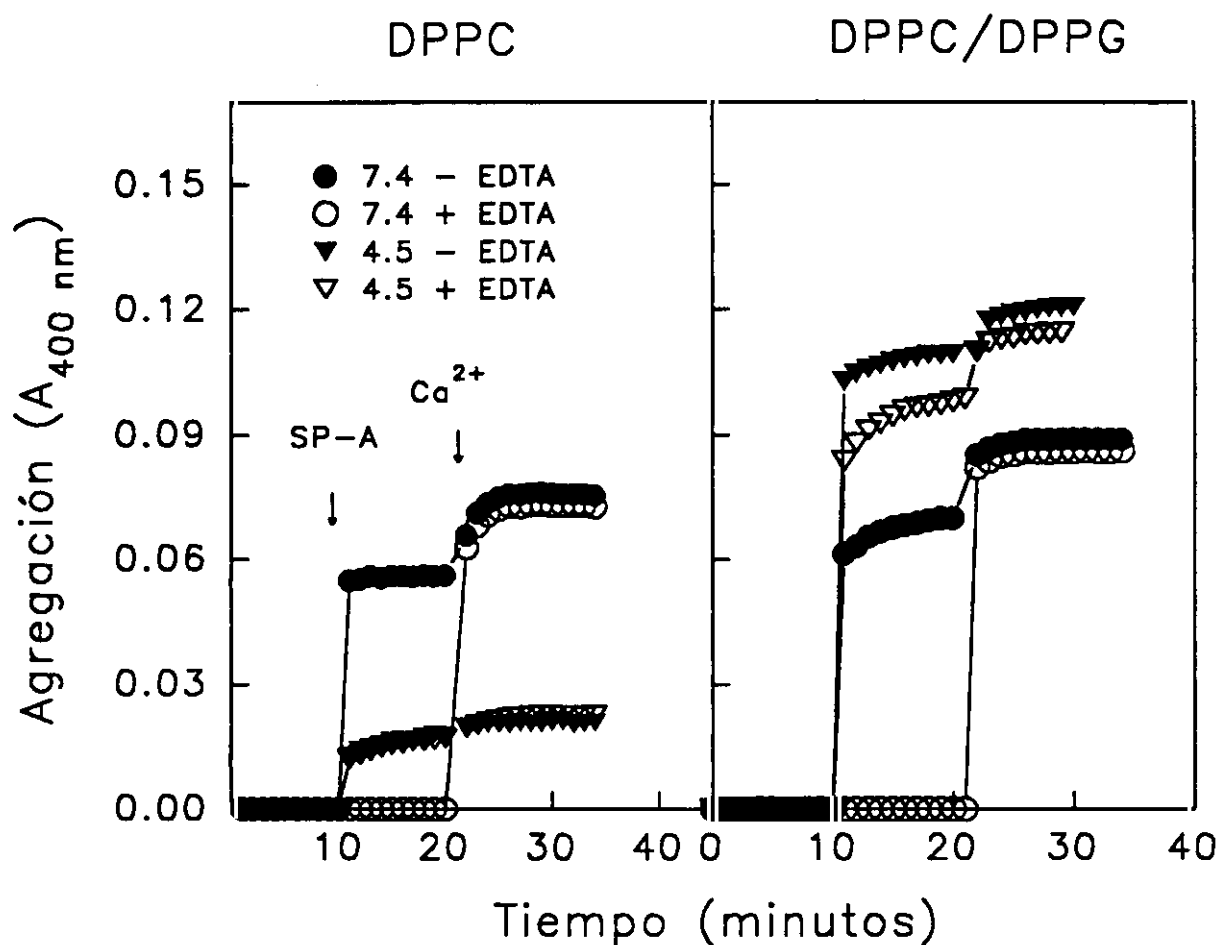
Los resultados obtenidos muestran una marcada reducción de la agregación de vesículas neutras a pH ácido. Los resultados podrían explicarse de acuerdo con los dos modelos propuestos para la agregación de vesículas inducida por la SP-A. La unión de carbohidratos a la SP-A se anula a pH ácido (Haurum et al., 1993). Por tanto, es posible que a pH ácido no puedan establecerse interacciones proteína-proteína de tipo lectina. En esas condiciones sólo podrían establecerse interacciones proteína-lípido, lo que conduciría a una extensión menor del agregado.



**FIGURA 65.** Efecto de la fuerza iónica en la agregación de vesículas de DPPC/DPPG a pH ácido.

Las vesículas se añadieron en las cubetas de muestra y referencia, en tampón Tris-HCl 5 mM pH 7.4 o en tampón Tris-HCl 5 mM, Acetato sódico 25 mM, pH 4.5, en ambos casos en presencia y ausencia de NaCl 150 mM. Tras 10 minutos se añadió en la cubeta de muestra SP-A (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Transcurridos otros 10 minutos se adicionó  $\text{CaCl}_2$  5 mM en las cubetas de muestra y referencia.

Los resultados obtenidos también podrían explicarse como consecuencia de una reducción de la afinidad de la SP-A por los fosfolípidos a pH ácido. Como consecuencia de ello podrían reducirse el entrecruzamiento de vesículas de fosfolípidos y SP-A, lo que también conduciría a la reducción de la extensión del agregado. Los resultados que aparecen en esta memoria muestran que la SP-A tiene una gran tendencia a autoagregar a pH ácido.



**FIGURA 66.** Agregación de vesículas de fosfolípidos a pH ácido en presencia y ausencia de EDTA.

Las vesículas de fosfolípidos se añadieron en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 o en tampón Tris-HCl 25 mM, Acetato sódico 25 mM pH 4.5, en ambos casos en presencia y ausencia de EDTA 1 mM. Con intervalos de 10 minutos se añadió SP-A (en la cubeta de muestra) y calcio (en las cubetas de muestra y referencia. Las concentraciones de SP-A y calcio fueron 5  $\mu$ g/ml y 5 mM, respectivamente.

Los estudios estructurales realizados sugieren que el tipo de agregación de la SP-A a pH ácido es distinto del que se produce a pH neutro inducido por calcio y cloruro sódico. El espectro de dicroísmo circular refleja asimismo la diferencia estructural de la SP-A a pH 4.5 frente a pH 7.4. No se conoce la región de la SP-A que interacciona con los fosfolípidos, aunque se ha propuesto que la región de unión entre el dominio colagénico y el dominio

tipo lectina es la zona implicada en la unión a los lípidos (Ross et al., 1986). Esa región reúne los requisitos estructurales necesarios para formar una hélice anfipática (Mc Lean et al., 1993). En esa región existe abundancia de residuos cargados negativamente (4), 3 histidinas y 1 arginina. La acidificación del medio podría reducir la carga superficial de la región y podría favorecer la autoasociación para esconder los residuos hidrofóbicos del medio. De esta manera podría explicarse la tendencia de la SP-A a autoagregar y quizás reduciría la afinidad de la proteína por los lípidos.

La diferencia observada en la agregación de vesículas ácidas y neutras parece, en principio, atribuible a razones electrostáticas. Al acidificarse el medio pueden aparecer regiones cargadas positivamente en la proteína que favorezcan la unión de vesículas cargadas negativamente. Fenómenos de este tipo se han descrito. Distintas proteínas como la mioglobina, ribonucleasa, lisozima e inhibidor de tripsina unen fosfolípidos ácidos cuando el pH del medio es inferior a su punto isoeléctrico y el número de cargas positivas de la proteína es superior al de negativas al menos en 3 unidades (Bergers et al., 1993). No se observa unión de fosfolípidos zwitteriónicos en ningún caso a cualquier valor de pH, lo que demuestra la naturaleza electrostática de la interacción. Asimismo, una interacción de este tipo controla la unión de la melitina a los fosfolípidos (Beschiaswili y Seelig, 1990) y de numerosas toxinas como la colicina A (Parker et al., 1990) o la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (Menestrina et al., 1991). En este último caso se requiere además un cambio estructural en la toxina inducido por el pH ácido (Menestrina et al., 1990).

Por tanto, la acidificación del medio modifica de manera considerable las propiedades de agregación de la SP-A. Se reduce de manera considerable la agregación de vesículas neutras y se incrementa la agregación de vesículas ácidas. Las diferencias observadas podrían tener implicaciones funcionales en la organización de los lípidos del surfactante en los cuerpos lamelares, donde el pH es ácido (Chander et al., 1986) y en el espacio alveolar donde es neutro (Nielson et al., 1981, 1984) y podría tener implicaciones en la transformación de los cuerpos lamelares en mielina tubular. El cambio de pH ácido a pH neutro podría implicar la disociación de agregados lipídicos inducidos por la SP-A, permitiendo la desorganización del contenido de los cuerpos lamelares en mielina tubular. Asimismo, el empaquetamiento de las bicapas lipídicas en los cuerpos lamelares podría depender de la presencia de fosfolípidos ácidos y, entre otras razones, podría explicar la elevada proporción

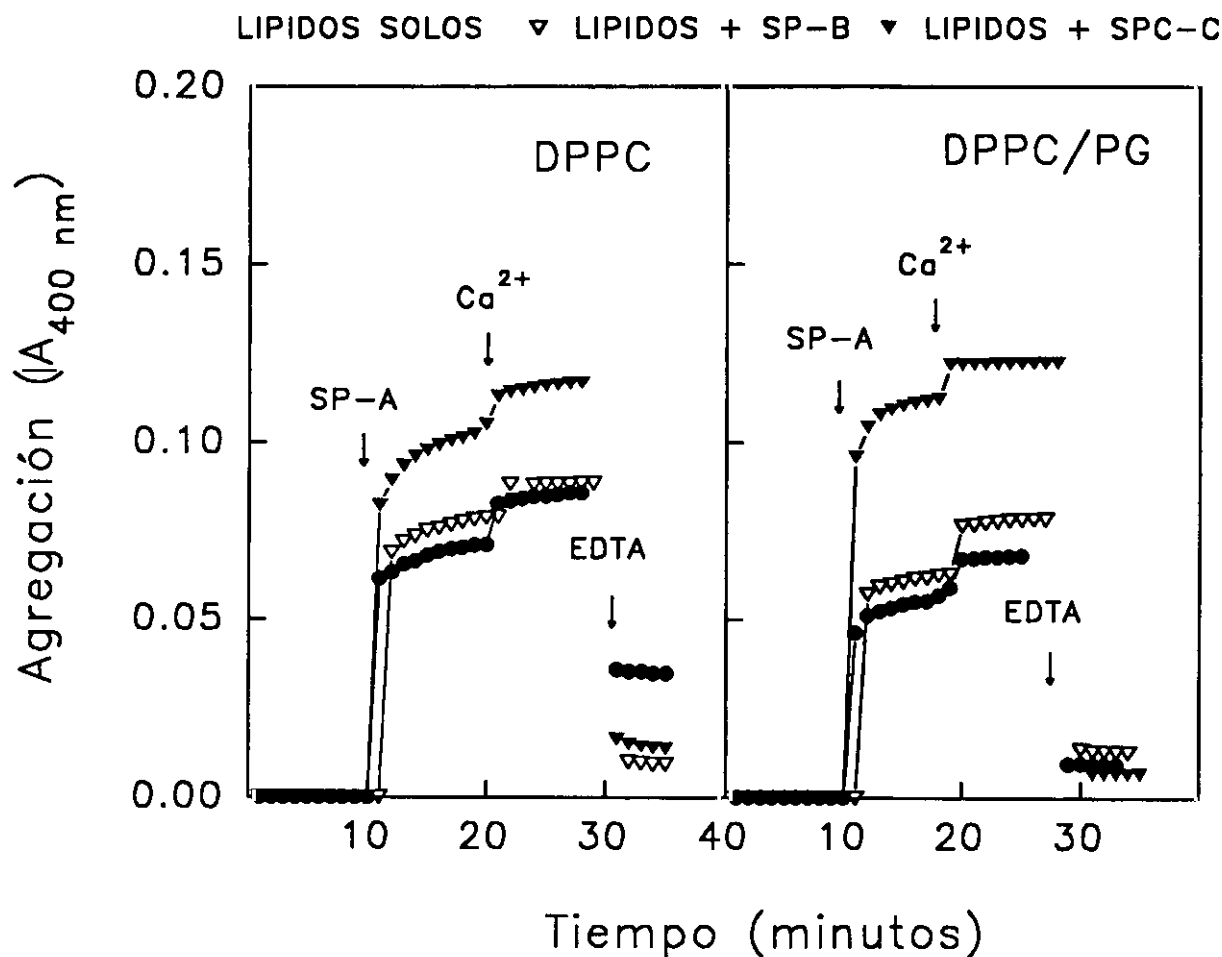
de fosfolípidos ácidos, fosfatidilglicerol o fosfatidilinositol, encontrada en el surfactante pulmonar.

#### 4.4.9. AGREGACION DE COMPLEJOS LIPIDO-PROTEINA HIDROFOBICA

Por último se ha investigado la capacidad de la SP-A de cerdo de agregar complejos lipoproteicos constituidos por la mezcla de fosfolípidos con las proteínas SP-B y SP-C. La relación lípido/proteína hidrofóbica empleada ha sido 10:1 (en peso). Previamente a los estudios de agregación se han caracterizado ambas proteínas desde el punto de vista de su movilidad electroforética y composición de aminoácidos.

En la Figura 67 se observa que a pH 7.4, se produce un incremento de absorbancia mayor cuando la SP-A de cerdo se añade a la cubeta de muestra que contiene complejos fosfolípido/SP-C que cuando se añade a cubetas que contienen vesículas de fosfolípidos o complejos fosfolípido/SP-B. En todos los casos la máxima agregación se produce tras la adición de calcio milimolar. El proceso se revierte en presencia de EDTA 10 mM. Los resultados son semejantes para vesículas ácidas y neutras.

Se ha publicado que la SP-B induce agregación de vesículas de fosfolípidos en ausencia de calcio (Poulain et al., 1992). Por tanto, es posible que la menor agregación inducida por la SP-A para complejos lípido/SP-B se deba a que ya exista agregación lipídica antes de adicionar la SP-A. Al añadir esta última se registra la variación de absorbancia inducida por esta proteína. En definitiva se trata de una diferencia de absorbancia que es menor para los complejos lipoproteicos que contienen SP-B. Para comprobarlo se ha medido la absorbancia de complejos fosfolípido/SP-C, fosfolípido/SP-B y vesículas de fosfolípidos frente a agua destilada que se coloca en la cubeta de referencia (Resultados no mostrados). Se aprecia que en ausencia de SP-A, la absorbancia es mayor para complejos lípido/SP-B que para complejos lípido/SP-C y vesículas de fosfolípidos, lo que confirma la existencia de agregación inducida por la SP-B. La SP-A induce agregación en todos los casos. En presencia de las proteínas hidrofóbicas la absorbancia de las muestras es marcadamente superior a la de las vesículas de fosfolípidos que no contienen SP-B ni SP-C.



**FIGURA 67. Agregación de complejos fosfolípido/proteína hidrofóbica inducida por la SP-A.**

Los fosfolípidos, con o sin SP-B y SP-C se añadieron a las cubetas de muestra y referencia en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 en presencia de NaCl 100 mM. Con intervalos de tiempo de 10 minutos se añadió SP-A (cubeta de muestra), calcio (cubetas de muestra y referencia) y EDTA (cubetas de muestra y referencia). Las concentraciones de fosfolípidos, SP-A, calcio y EDTA fueron 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 mM y 5 mM. La relación fosfolípido/proteína hidrofóbica fue 10:1 (en peso).

Poulain y colaboradores (1992) han publicado que la SP-A, que no induce fusión de membranas, estimula la capacidad fusogénica de la SP-B en presencia de calcio. De acuerdo con los resultados publicados por estos autores, sería esperable que la adición de EDTA no revirtiera la agregación de muestras en presencia de SP-A, SP-B y calcio. Sin embargo

(Figura 67) en presencia de EDTA 10 mM la absorbancia de muestras que tienen SP-A y las que carecen de esta proteína son semejantes. Por tanto no es probable que la SP-A incremente la capacidad fusogénica de la SP-B, al menos en nuestras condiciones experimentales.

La presencia de las proteínas hidrofóbicas puede modificar los requisitos y características de la agregación de vesículas inducida por la SP-A. La adición de SP-B o SP-C podría alterar las propiedades de la SP-A a través de interacciones proteína-proteína o bien modificar las propiedades de los lípidos. Hasta el momento no ha aparecido ningún trabajo que describa la existencia de interacciones proteína-proteína en el surfactante pulmonar, aunque se ha descrito que la SP-A mejora la adsorción de extractos lipídicos del surfactante que contienen las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C (Hawgood et al 1987, Baatz et al 1990) y que la SP-A en presencia de calcio aumenta la capacidad fusogénica de la SP-B (Poulain et al 1992). Asimismo, la formación de la mielina tubular requiere la presencia simultánea de SP-A y SP-B en presencia de fosfolípidos ácidos y calcio (Suzuki et al 1989, Williams et al 1991, Poulain et al 1992), aunque para ello no necesariamente tienen que establecerse interacciones proteína-proteína. Sí se ha observado que las proteínas hidrofóbicas modifican las propiedades de los lípidos. Mediante microscopía electrónica se ha observado que vesículas de DPPC/PG de huevo en presencia de SP-B aparecen como discos de membrana de 50-70 nm, a veces agregados y estructuras multilamelares (Poulain et al 1992). La SP-C también induce la formación de discos y fragmentos de membranas sin que se aprecien estructuras multilamelares, probablemente debido a que la SP-C no induce mezcla del componente lipídico de membranas (Poulain et al., 1992). Es por tanto posible, que la agregación inducida por la SP-A se produzca sobre estructuras de membrana distintas de las vesículas unilamelares pequeñas empleadas en los estudios en ausencia de proteínas hidrofóbicas. No hemos caracterizado los complejos lípido/SP-B y lípido/SP-C empleados en nuestros ensayos, y las condiciones de preparación de los complejos lipoproteicos utilizados por Poulain y colaboradores y las nuestras son diferentes. La principal diferencia consiste en que las proteínas hidrofóbicas se incorporan disueltas en metanol a las vesículas formadas previamente. Por tanto, no puede asegurarse que los complejos lipoproteicos de nuestros ensayos sean semejantes a los descritos por Poulain y colaboradores (1992), pero es bastante probable que las proteínas hidrofóbicas modifiquen sustancialmente la organización de los lípidos. Así, se ha descrito que la SP-B induce mezcla del componente lipídico de vesículas (Oosterlaken-Dijksterhuis et al., 1992; Poulain et al., 1992). La SP-C no induce fusión de



membranas (Oosterlaken-Dijksterhuis et al., 1992; Poulain et al., 1992). Tanto la SP-B (Hawgood et al., 1987; Revak et al., 1988) como la SP-C (Warr et al., 1987; Revak et al., 1988) aumentan la velocidad de adsorción de los fosfolípidos a la interfase aire-líquido.

Por tanto, las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C incrementan la capacidad de agregación de la SP-A. El proceso podría implicar la existencia de interacciones proteína-proteína o bien producirse a través de la modificación de las propiedades de los lípidos.

#### 4.4.10. SUMARIO

Los resultados que se muestran en este apartado muestran que la actividad de agregación de vesículas de fosfolípidos inducida por la SP-A a pH neutro se inhibe en presencia de EDTA, lo que demuestra que el proceso es dependiente de calcio. La agregación de vesículas se desencadena a concentraciones de calcio inferiores a 5  $\mu$ M, y alcanza un valor máximo para una concentración de calcio del orden de 0.5 mM. El requerimiento de calcio de la agregación de vesículas inducida por la SP-A es diferente al de la autoagregación de la proteína, lo que indica que el proceso de agregación lipídica no se produce como consecuencia de la autoagregación de la SP-A unida a lípidos. La máxima actividad de agregación de vesículas se alcanza a una relación fosfolípido/SP-A en torno a 10:1-13:1.

La desglicosilación de la SP-A reduce su actividad de agregación de vesículas (aproximadamente un 25%), sin que se modifique el requerimiento de calcio del proceso. Sugerimos dos posibles mecanismos a través de los cuales se podría producir la agregación de vesículas inducida por la SP-A: la agregación de vesículas se produce, según esta primera hipótesis, como consecuencia de la unión de las vesículas a la SP-A. La naturaleza oligomérica de la proteína permitiría la unión de más de una vesícula de fosfolípidos a la SP-A. El tamaño de las vesículas permitiría la interacción con éstas de más de una molécula de SP-A. De acuerdo con esta hipótesis, la desglicosilación de la SP-A podría alterar la estructura de la proteína, disminuyendo su capacidad de agregar vesículas. El segundo modelo propuesto para la agregación de vesículas de fosfolípidos inducida por la SP-A, supone que simultáneamente a la agregación producida por interacciones proteína-lípido, se producen interacciones proteína-proteína, de tipo lectina. La desglicosilación de la SP-A anula estas interacciones, disminuyendo la extensión del agregado.

La agregación de vesículas de fosfolípidos (DPPC, DMPG y DPPC/DPPG) se reduce a temperaturas por encima de la temperatura de transición de fase de las mismas, probablemente debido a una menor interacción de la SP-A con las vesículas en el estado fluido.

La SP-A agrega vesículas de fosfolípidos neutros tanto a baja fuerza iónica como a fuerza iónica fisiológica. La agregación de vesículas ácidas requiere la presencia de NaCl 150 mM. La inhibición de la agregación de vesículas ácidas a baja fuerza iónica podría deberse a la ausencia de interacción entre la SP-A y las vesículas en esas condiciones.

La SP-A agrega vesículas de fosfolípidos a pH ácido. El proceso es independiente de calcio, ya que la agregación no se inhibe en presencia de EDTA 1 mM. A pH ácido se produce la agregación de vesículas ácidas a baja fuerza iónica, probablemente por la neutralización a pH 4.5 de las cargas negativas superficiales de la SP-A que impedían la interacción de las vesículas ácidas con la SP-A a pH neutro. Además la agregación de vesículas a pH ácido y pH neutro son cualitativamente distintas. A pH 7.4 la extensión de la agregación es semejante para vesículas neutras y vesículas ácidas. A pH 4.5 se reduce la magnitud de la agregación de vesículas de DPPC y se incrementa la extensión de la agregación de vesículas de DPPC/DPPG. Los resultados podrían deberse o bien a la anulación de las interacciones lectina-lectina a pH ácido, como consecuencia de la ausencia de unión de los azúcares al sitio de unión de carbohidratos de la SP-A a pH ácido, o por una menor afinidad de la SP-A por los fosfolípidos a pH ácido. El incremento de la agregación de vesículas ácidas a pH ácido podría deberse a atracción electrostática entre zonas de la proteína cargadas positivamente y las cargas negativas de las vesículas. La presencia de fosfolípidos ácidos podría ser necesaria en los cuerpos lamelares, a pH ácido, y entre otras razones, podría explicar su abundancia en el surfactante.

Las proteínas hidrofóbicas incrementan la actividad de agregación de vesículas inducida por la SP-A. El proceso podría deberse a la alteración de las propiedades de los fosfolípidos o bien a la existencia de interacción entre la SP-A y las proteínas hidrofóbicas. En contraste con los resultados publicados por otros autores, en nuestras condiciones experimentales, la SP-A no parece incrementar la actividad fusogénica de la SP-B.

## **CONCLUSIONES**

- 1) Se han determinado algunas características estructurales de la SP-A de cerdo y humana, tales como composición de aminoácidos, movilidad electroforética y estructura secundaria. Las características estructurales de la SP-A humana han sido publicadas anteriormente por otros autores. Sin embargo, no hay datos en la bibliografía sobre las características estructurales de la SP-A porcina. En esta memoria se demuestra que la SP-A tiene características estructurales similares a la SP-A humana y que los datos obtenidos son similares a los publicados por otros autores.

Hasta el momento no hay datos de las características fluorescentes de la SP-A en ninguna especie. En esta memoria se recogen los espectros de emisión de fluorescencia de la SP-A porcina y humana. Dichos espectros se caracterizan por presentar dos máximos de emisión a 326 y 337 nm, tanto excitando a 275 como a 295 nm, lo que indica heterogeneidad en la emisión de los residuos de triptófano de la SP-A. La emisión de fluorescencia a esas longitudes de onda revela que los residuos de triptófano de la SP-A se encuentran parcialmente enterrados en la matriz proteica.

- 2) El segundo bloque de estudios realizados se han centrado en el estudiar el efecto del medio iónico (calcio, fuerza iónica y pH ácido) en la estructura de la SP-A. La SP-A sufre un cambio conformacional como consecuencia de la unión de calcio, en concentraciones del orden micromolar. Este cambio conformacional se manifiesta mediante espectroscopía de fluorescencia (incremento de la intensidad de emisión de fluorescencia, desplazamiento hacia el azul de los máximos de emisión y mayor protección frente al apagamiento por acrilamida) y susceptibilidad a la hidrólisis por tripsina (menor protección frente a la hidrólisis). La unión de calcio a concentraciones superiores a 0.5 mM a la SP-A o el NaCl, en presencia de calcio micromolar, inducen autoagregación de la SP-A. La desglicosilación de la SP-A o la presencia de manano no reducen la autoagregación de la proteína. La autoagregación de la SP-A provoca cambios en la estructura de la proteína que se manifiestan mediante espectroscopía de fluorescencia (disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia, menor protección frente al apagamiento por acrilamida y cambio del tipo de representación de Stern-Volmer del apagamiento de la fluorescencia por

acrilamida), dicroísmo circular (disminución de la banda de elipticidad negativa a 205 nm) y susceptibilidad a la hidrólisis por tripsina (menor protección frente a la hidrólisis).

La SP-A autoagrega a pH ácido. El proceso es independiente de calcio. La autoagregación de la SP-A a pH ácido induce cambios estructurales en la SP-A que se manifiestan mediante espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular. Los cambios observados en la estructura de la SP-A como consecuencia de la autoagregación de la proteína a pH ácido son cualitativamente idénticos a los que se producen en la forma agregada (inducida por calcio milimolar o fuerza iónica) de la SP-A a pH neutro.

- 3) Hasta el momento no se ha estudiado el efecto que tienen los lípidos sobre la estructura de la SP-A. Este ha sido el objetivo del tercer bloque de estudios realizados. La interacción de la SP-A humana y porcina con los fosfolípidos induce un cambio conformacional en la proteína que modifica sus propiedades fluorescentes (incremento de la intensidad de emisión de fluorescencia, mayor protección frente al apagamiento por acrilamida y cambio del tipo de representación de Stern-Volmer del apagamiento de la fluorescencia por acrilamida) y el espectro de dicroísmo circular (disminución de la banda de elipticidad negativa a 205 nm). Los efectos de distintas clases de fosfolípidos sobre la estructura de la SP-A son cualitativamente idénticos, pero cuantitativamente distintos: los cambios observados en la fluorescencia intrínseca de la SP-A porcina y humana son mayores en presencia de vesículas de DPPC que en presencia de DPPG, DPPC/DPPG y 1-palmitoil-LPC. No se produce ningún efecto con vesículas de PC de huevo. Asimismo, los fluoróforos de la SP-A de cerdo están más protegidos frente al apagamiento por acrilamida en presencia de vesículas de DPPC que en presencia de DPPG o LPC. En el caso de la SP-A humana sólo se observa protección de los triptófanos frente al apagamiento por acrilamida tras la interacción con vesículas de DPPC.

La presencia de fuerza iónica fisiológica es imprescindible para la interacción de la SP-A con vesículas cargadas negativamente. A baja fuerza iónica se reduce la interacción de vesículas de DPPC con la SP-A.

El incremento observado en la emisión de fluorescencia de la SP-A en presencia de vesículas de DPPC es mayor cuando las vesículas se encuentran en estado gel que cuando están en el estado líquido-cristalino.

- 4) El último bloque de estudios se han centrado en el efecto de la SP-A sobre los lípidos, en concreto la agregación de vesículas de fosfolípidos inducida por la SP-A. Se han estudiado los parámetros que gobiernan el proceso. La agregación de vesículas es dependiente de calcio. El proceso se produce a concentraciones de calcio del orden de 5  $\mu$ M. La agregación máxima se alcanza en presencia de calcio 0.5 mM. El requerimiento de calcio es distinto al de la autoagregación de la proteína, lo que indica que la agregación de vesículas de fosfolípidos no se produce como consecuencia de la autoagregación de la proteína. La máxima actividad de agregación se alcanza a una relación lípido/SP-A en torno a 10:1-13:1. La presencia de las cadenas oligosacáridas de la SP-A es importante para la máxima actividad de agregación de la proteína. La desglicosilación de la SP-A reduce un 25% su actividad de agregación de vesículas. El requerimiento de calcio para la proteína desglicosilada es idéntico al de la SP-A control. La agregación de vesículas de fosfolípidos es mayor cuando las vesículas se encuentran en el estado gel que cuando están en el estado líquido-cristalino.

La SP-A agrega vesículas de fosfolípidos neutros tanto a baja fuerza iónica como fuerza iónica fisiológica. La agregación de vesículas ácidas requiere la presencia de NaCl 150 mM.

La SP-A agrega vesículas de fosfolípidos a pH ácido. El proceso es independiente de calcio. A pH ácido disminuye la extensión de la agregación de vesículas neutras y aumenta la extensión de la agregación de vesículas ácidas.

Las proteínas hidrofóbicas incrementan la actividad de agregación de vesículas inducida por la SP-A.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Alcorn, J.L. y Mendelson, C.R. (1993) *Am. J. Physiol.* **264**, L27-L35.
- Ansfield, M.J., Kaltreider, H.B., Benson, B.J. y Caldwell, J.L. (1979) **122**, 1062-1066.
- Ansfield, M.J. y Benson, B.J. (1980) **125**, 1093-1098.
- Auten, R.L., Watkins, R.H., Shapiro, D.L. y Horowitz, S. (1990) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **3**, 491-496.
- Avery, M.E. y Mead, J. (1959) *Am. J. Dis. Child.* **97**, 517-523.
- Baatz, J.E., Elledge, B. y Whitsett, J.A. *Biochemistry* (1990) **29**, 6714-6720.
- Baatz, J.E., Smyth, K.L., Whitsett, J.A., Baxter, C. y Absolom, D.R. (1992) *Chem. Phys. Lipids* **63**, 91-104.
- Ballard, P.L. (1989) *Endocrine. Rev.* **10**(2), 165-181.
- Ballard, P.L., Hawgood, S., Liley, H., Wellenstein, G., Gonzales, L.W., Benson, B., Cordell, B. y White, R.T. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9527-9531.
- Bambang-Oetomo, S., Reijngond, D., Ennema, J.J., Okken, A. y Wildevuur, C.R.H. (1988) *Lung* **166**, 65-73.
- Baritussio, A., Bellina, L., Carraro, R., Rossi, A., Enzi, G., Magoon, M.W. y Mussini, I. (1984) *Eur. J. Clin. Invest.* **14**, 24-29.
- Baritussio, A., Benevento, M., Pettenazzo, A., Bruni, R., Santucci, A., Dalzoppo, D., Barcaglioni, P. y Crepaldi, G. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **1006**, 19-25.
- Barr, H.A., Nicholas, T.E. y Power, J.H.T. (1988) *Br. J. Pharmacol.* **93**, 473-482.
- Bates, S.R., Beers, M.F. y Fisher, A.B. (1992) *Am. J. Physiol.* **263**, L333-L341.
- Beaven, G.H. y Holiday, E.R. (1952) *Adv. Protein. Chem.* **7**, 319-382.
- Beers, M.F. y Fisher, A.B. (1992) *Am. J. Physiol.* **263**, L151-L160.
- Benson, B., Williams, M.C., Sueishi, K., Goerke, J. y Sargeant, T. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **793**, 18-27.
- Benson, B., Hawgood, S., Schilling, J., Clements, J., Damn, D., Cordell, B. y White, R.T. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6379-6383.
- Beppu, O.S., Clements, J.A. y Oerke, J. (1983) *J. Appl. Physiol.* **55**, 496-502.
- Bergers, J.J., Vingerhoeds, M.H., Van Bloois, L., Herron, J.N., Janssen, L.H.M., Fischer, M.J.E. y Crommelin, D.J.A. (1993) *Biochemistry* **32**, 4641-4649.
- Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959) *Can. J. Biochem.* **37**, 911-917.
- Boggaram, V., Quink, K. y Mendelson, C.R. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**, 2939-2947.
- Breslin, J.S. y Weaver, T.E. (1992) *Am. J. Physiol.* **262**, L699-L707.
- Brodsky-Doyle, B., Leonard, K.R. y Reid, K.B.M. (1976) *Biochem. J.* **159**, 279-286.
- Brown, E.S. (1964) *Am. J. Physiol.* **207**, 402-406.



- Brown, L.A.S. y Longmore, W.J. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 66-72.
- Brown, L.A.S. y Wood, L.H. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **1001**, 76-81.
- Brown, L.A.S. y Chen, M. (1990) *Am. J. Physiol.* **258**, L301-L307.
- Brumley, G. y Van den Bosch, H. (1977) *J. Lipid Res.* **18**, 523-532.
- Bruns, G., Stroh, H., Veldman, G.M., Latt, S.A. y Floros, J. (1987) *Hum Genet* **76**, 58-62.
- Burri, P.H. (1985) *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* **76**, 2-12.
- Casals, C., Acebal, C., Cruz-Alvarez, M., Estrada, P. y Arche, R. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* **217**, 422-433.
- Casals, C., Herrera, L., Miguel, E., García-Barreno, P. y Municio, A.M. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **1003**, 201-203.
- Casals, C., Herrera, L., Miguel, E., García-Barreno, P. y Municio, A.M. (1990) *Prog. Respir. Res. Basel, Karger* **25**, 338-342.
- Chander, A., Johnson Jr., R.G., Reichert, J. y Fisher, A.B. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 6126-6231.
- Chander, A. (1989) *Am. J. Physiol.* **257**, L354-L360.
- Chen, M. y Brown, L.A.S. (1990) *Am. J. Physiol.* **258**, L195-L200.
- Chevallier, G. y Collet, A.J. (1972) *Anat. Rec.* **174**, 289-310.
- Chung, J., Yu, S-H., Whitsett, J.A., Harding, P.G.R. y Possmayer, F. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **1002**, 348-358.
- Claypool, W.D., Wang, D.L., Chander, A. y Fisher, A.B. (1984a) *J. Clin. Invest.* **74**, 677-684.
- Claypool, W.D., Wang, D.L., Chander, A. y Fisher, A.B. (1984b) *Exp. Lung Res.* **6**, 215-222.
- Coalson, J.J., Winter, V.T., Martin, H.M. y King, R.J. (1986) *Am. Rev. Respir. Dis.* **133**, 230-237.
- Cockle, A.S., Epand, R.M. y Moscarello, M.A. (1978) *Biochemistry* **17**, 630-637.
- Cockshutt, A., Weitz, J. y Possmayer, F. (1990) *Biochemistry* **29**, 8424-8429.
- Corbet, A. y Owens, M. (1991) *Pediatr. Res.* **30**, 190-192.
- Corbet, A., Voelker, R., Murphy, F. y Owens, M. (1991) *Am. J. Med. Sci.* **301**(2), 102-114.
- Crecelius, C.A. y Longmore, W.J. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **795**, 238-246.
- Crouch, E., Rust, K., Chang, D., Persson, A y Parghi, D. (1991) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1991** **5**, 13-18.
- Crouch, E., Parghi, D., Kuan, S.-F. y Persson, A. (1992) *Am. J. Physiol.* **263**, L60-L66.
- Crystal, R.G. (1991) *The Lung: Scientific Foundations*. Ed R.G Crystal, Raven Press, NY, 527-537.

- Curstedt, T., Jörnvall, H., Robertson, B., Bergman, T. y Berggren, P. (1987) *Eur. J. Biochem.* **168**, 255-262.
- Curstedt, T., Johansson, J., Barros-Söderling, J., Robertson, B. y Nilsson G. (1988) *Eur. J. Biochem.* **172**, 521-525.
- Curstedt, T., Johansson, J., Persson, P., Eklund, A., Robertson, B., Löwenadler, B. y Jörnvall, H. (1990) *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2985-2989.
- D'Amore-Bruno, M., Wikenheiser, K.A., Carter, J.E., Clarck, J.C.y Whitsett, J.A. (1991) *Am. J. Physiol.* **262**, L40-L47
- De Kroon, A.I.P.M., Soekarjo, M.W., De Gier, J. y De Kruijff, B. (1990) *Biochemistry* **29**, 8229-8240.
- Den Breejen, J.N., Batenburg, J.J. y Van Golde, L.M.G. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **1001**, 277-282.
- De Vries, A.C.J., Batenburg, J.J. y Van Golde, L.M.G. (1985 a) *Biochim. Biophys. Acta* **833**, 93-99.
- De Vries, A.C.J., Schram, A.W., Van den Berg, M., Tager, J.M., Batenburg, J.J. y Van Golde, L.M.G. (1985 b) *Biochim. Biophys. Acta* **922**, 259-269.
- Dobbs, L.G., Mason, R.J., Williams, M.C., Benson, B.J. y Sueishi, K. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **713**, 118-127.
- Dobbs, L.G., Wright, J.R., Hawgood, S., Gonzalez, R., Venstrom, K. y Nellenbogen, J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1010-1014.
- Dorn, C.C., Rice, W.R. y Singleton, F.M. (1989) **97**, 163-170.
- Drickamer, K., Mamon, J.F., Binns, G. y Leung, J.O. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 770-778.
- Drickamer, K., Dordal, H. y Reynolds, L. (1986) *J. Mol. Biol.* **261**, 6878-6887
- Dulley, J.R. y Grieve, P.A. (1975) *Anal. Biochem.* **64**, 136-141.
- Eckenhoff, R.G. y Somlyo, A.P. (1988) *Am. J. Physiol.* **254**, C614-C620.
- Efrati, H., Hawgood, S., Williams, M.C., Hong, K. y Benson, B.J. (1987) *Biochemistry* **26**, 7986-7993.
- Eftink, M.R. y Ghiron, C.A. (1976) *Biochemistry* **15**, 672-680.
- Eftink, M.R. y Ghiron, C.A. (1981) *Anal. Biochem.* **114**, 199-227.
- Egberts, J., Beintema-Dubbeldam, A. y de Boers, A. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **919**, 90-92.
- Eisinger, J. (1969) *Biochemistry* **8**, 3902-3908.

- Ekelund, L., Andersson, K.E. y Enhorning, G. (1985) en *Anti-asthma Xantines and adenosines* (Ed. Andersson, K.E. y Persson, C.G.A.) pp. 202-208. Amsterdam. Excerpta Medica.
- Emrie, P.A., Jones, C., Hoffman, T. y Fisher, J.H. (1988) *Somat. Cell Mol. Genet.* **14**, 105-110.
- Emrie, P.A., Shannon, J.M., Mason, R.J. y Fisher, J.H. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **994**, 215-221.
- Endo, H. y Oka, T. (1991) *Early Hum. Dev.* **25**, 149-156.
- Fagan, S.M. y Keough, K.M.W. (1988) *Chem. Phys. Lipids* **48**, 59-67.
- Farrell, P.M., Bourbon, J.R., Notter, R.H., Marin, L., Nogue, L.M. y Whitsett J.A. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1044**, 84-90.
- Fisher, J.H. y Chander, A. (1985) *Ann. Rev. Physiol.* **47**, 789-802.
- Fisher, J.H., Kao, F.T., Jones, C., Tyler White, R., Benson, B.J. y Mason, R.J. (1987) *Am. J. Hum. Genet.* **40**, 503-511.
- Fisher, J.H., Emrie, P.A., Drabkin, H.A., Kushnik, T., Gerber, M., Hoffman, T. y Jones, C. (1988 a) *Am. J. Hum. Genet.* **43**, 436-441.
- Fisher, J.H., Emrie, P.A., Shannon, J., Sano, K., Hattler, B. y Mason, R.J. (1988 b) *Biochim. Biophys. Acta* **959**, 338-345.
- Fisher, J.H., Shannon, J.M., Hofmann, T. y Mason, R.J. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **995**, 225-230.
- Fleming, B.D. y Keough, K.M.W. (1983) *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **61**, 882-891.
- Fleming, B.D. y Keough, K.M.W. (1988) *Chem. Phys. Lipids* **49**, 81-86.
- Floros, J., Phelps, D.S. y Taeusch, H.W. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 495-500.
- Floros, J., Steinbrink, R., Jacobs, K., Phelps, D., Kriz, R., Recny, M., Sultzman, L., Jones, S., Taeusch, H.W., Frank, F.H. y Fritsch, E.F. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 9029-9033.
- Freedman, R.B. (1989) *Cell* **57**, 1069-1072.
- Froh, D., Ballard, P.L., Williams, M.C., Gonzales, J., Goerke, J., Odom, M.W. y Gonzales, L.W. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1052**, 78-79.
- Fujiwara, T., Maeta, H., Chida, S., Morita, T., Watabe, Y. y Abe, T. (1980) *Lancet* **1**, 55-59.
- Gasset, M., Oñaderra, M., Goormaghtigh, E. y Gavilanes, J.G. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1080**, 51-58.
- Gehr, P., Bachofen, N., Weibel, E.R. (1978) *Resp. Physiol.* **32**, 121-140.
- Gerke, V. y Weber, K. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**(3), 1668-1695.
- Gilfillan, A.M. y Rooney, S.A. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **833**, 336-341.

- Gilfillan, A.M. y Rooney, S.A. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **876**, 22-27.
- Gilfillan, A.M., Smart, D.A. y Rooney S.A. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **877**, 151-157.
- Gilfillan, A.M. y Rooney, S.A. (1987 a) *Biochim. Biophys. Acta* **917**, 18-23.
- Gilfillan, A.M. y Rooney, S.A. (1987 b) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **241** (3), 907-914.
- Gilfillan, A.M. y Rooney, S.A. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **959**, 31-37.
- Glasser, S.W., Korfhagen, T.R., Weaver, T., Pilot-Matias, T., Fox, J.L. y Whitsett, J.A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4007-4011.
- Glasser, S.W., Korfhagen, T.R., Weaver, T.E., Clark, J.C., Pilot-Matias, T., Meuth, J., Fox, J.L. y Whitsett, J.A. (1988 a) *J. Biol. Chem.* **263**, 9-12.
- Glasser, S.W., Korfhagen, T.R., Perme, C.M., Pilot-Matias, T. Kister, S.E. y Whitsett, J.A. (1988 b) *J. Biol. Chem.* **263**, 10326-10331.
- Glasser, S.W., Korfhagen, T.R., Bruno, M.D., Dey, C. y Whitsett, J.A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 21986-21991.
- Glasser, S.W., Korfhagen, T.R., Clark, J.C. Bruno, M.D., McMahan, M.J. y Whitsett, J.A. (1990 b). *Am. Rev. Respir. Dis.* **141**, A693.
- Gobran, L.I. y Rooney, S.A. (1990) *Am. J. Physiol.* **258**, L45-L51.
- Goerke, J. y Gonzales, J. (1981) *J. Appl. Physiol.* **51**, 1108-1114.
- Goñi, F.M., Prado, A. y Milicua, J.C.G. (1981) *Comp. Biochem. Physiol.* **69B**, 9-13.
- Gräbner, R. y Meerbach, W. (1991) *Am. J. Physiol.* **261**, L472-L477.
- Grainger, D.W., Reichert, A., Ringsdorf, H. y Salesse, C. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1023**, 365-379.
- Grathwohl, C., Newman, G.E., Phizackerley, P.J.R. y Town, M-H (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **552**, 509-518.
- Griese, M., Gobran, L.I., Douglas, J.S. y Rooney, S.A. (1991 a) *Am. J. Physiol.* **260**, L52-L60.
- Griese, M., Gobran, L.I. y Rooney, S.A. (1991 b) *Am. J. Physiol.* **260**, L586-L593.
- Griese, M., Gobran, L.I. y Rooney, S.A. (1991 c) *Am. J. Physiol.* **261**, L140-L147.
- Griese, M., Gobran, L.I. y Rooney, S.A. (1991 d) *Am. J. Physiol.* **261**, L434-L442.
- Griese, M., Gobran, L.I. y Rooney, S.A. (1993) *Lung* **171**, 75-86.
- Gross, N.J. (1994) *Prog. Respir. Res. Basel, Karger* **27**, 117-120.
- Gross, N.J. y Narine, K.R. (1989) *J. Appl. Physiol.* **66**, 342-349.
- Gross, N.J. y Schultz, R.M. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1044**, 222-230.
- Gross, N.J. y Schultz, R.M. (1992) *Am. J. Physiol.* **262**, L446-L453.
- Guyton, A.C., Moffat, D.S., Adair, T.H. (1984) en *Pulmonary Surfactant* (Eds.: Robertson B., Van Golde, L.M.G. y Batenburg, J.J.) pp. 171-185, Elsevier, Amsterdam.

- Haagsman, H.P. (1994) *Biochem. Soc. Trans.* **22**, 100-106.
- Haagsman, H.P. y Van Golde, LMG (1991) *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 375-394. Haagsman, H.P., Hawgood, S., Sargeant, T., Buckley, R., White, T., Drickamer K., Benson, B.J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 13877-13880.
- Haagsman, H.P., White, R.T., Schilling, J., Lau, K., Benson, B.J., Golden, J., Hawgood, S. y Clements, J.A. (1989) *Am. J. Physiol.* **257**, L421-L429.
- Haagsman, H.P., White, R.T., Sargeant, T., Hauschka, P.V., Benson, B., Hawgood, S. (1990) *Biochemistry* **29**, 8894-8900.
- Haagsman, H.P., Elfring, R.H., Van Buel, B.L.M. y Voorhout, W.F. (1991) *Biochem. J.* **275**, 273-276.
- Haas, C., Voss, T. y Engel, J. (1991) *Eur. J. Biochem.* **197**, 799-803.
- Hall, S.B., Venkitaraman, A.R., Whitsett, J.A., Holm, B.A. y Notter, R.H. (1992) *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**, 24-30.
- Harwood, S. y Richards, R.J. (1985) *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 1079-1081.
- Haurum, J.S., Thiel, S., Haagsman, H.P., Laursen, S.B., Larsen, B. y Jensenius, J.C. (1993) *Biochem. J.* **293**, 873-878.
- Hawgood, S. (1989) *Am. J. Physiol.* **257**, L13-L22.
- Hawgood, S. (1991) *The Lung: Scientific Foundations*. Ed R.G. Crystal, Raven Press, NY, 247-261.
- Hawgood, S., Benson, B. y Hamilton, R.L. (1985) *Biochemistry* **24**, 184-190.
- Hawgood, S., Benson, B.J., Schilling, J., Damm, D., Clements, J.A. y White, R.T. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 66-70.
- Hawgood, S. y Shiffer, K. (1991) *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 375-394.
- Hawgood, S., Latham, D., Borchelt, J., Damm, D., White, T., Benson, B. y Wright, J.R. (1993) *Am. J. Physiol.* **264**, L290-L299.
- Hildebran, J.N., Goerke, J. y Clements, J.A. (1979) *J. Appl. Physiol.* **47**, 604-611.
- Hirs, C.H.N. (1967) *Methods Enzymol.* **11**, 197-199.
- Hoekstra, R.E., Jackson, J.C., Myers, T.F., Frantz III, I.D., Stern, M.E., Powers, W.F., Maurer, M., Raye, J.R., Carrier, S.T., Gunkel, J.H. y Gold A.J. (1991) *Pediatrics* **88** (1), 10-18.
- Holmskov, U., Teisner, B., Willis, A.C., Reid, K.B.M. y Jensenius, J.C. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 10120-10125.
- Hook, G.E.R. y Gilmore, L.B. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 9211-9220.

- Horowitz, A.D., Elledge, B., Whitsett, J.A. y Baatz, J.E. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1107**, 44-54.
- Hylka, V. y Doneen, B.A. (1982) *J. Exp. Zool.* **220**, 71-80.
- Jacobs, K.A., Jobe, A.H., Ikegami, M. y Jones, S. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **834**, 172-179.
- Jacobs, K.A., Phelps, D.S., Steinbrink, R., Fisch, J., Kriz, R., Mitsock, L., Dougherty, J.P., Taeusch, W. y Floros, J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 9808-9811.
- Jobe, A. e Ikegami, M. (1987) *Am. Rev. Respir. Dis.* **136**, 1256-1275.
- Jobe, A., Ikegami, M., Sarton-Miller, I., Jones, S. y Yu, G. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **666**, 47-57.
- Johansson, J., Curstedt, T., Robertson, B. y Jörnvall, H. (1988) *Biochemistry* **27**, 3544-3547.
- Johansson, J., Curstedt, T. y Jörnvall, H. (1991 a) *Biochemistry* **30**, 6917-6921.
- Johansson, J., Persson, P., Löwenadler, B., Robertson, B., Jörnvall, H. y Curstedt, T. (1991 b) *FEBS Lett.* **281** (1,2), 119-122.
- Johansson J., Jörnvall H. y Curstedt T. (1992) *FEBS Lett.* **301**(2), 165-167.
- Juers, J.A., Rogers, R.M., McCurdy, J.B. y Cook, W.W. (1976) *J. Clin. Invest.* **58**, 271-275.
- Kai, H., Isohama, Y., Takaki, K., Oda, Y., Murahara, K., Takahama, K. y Miyata, T. (1992) *Eur. J. Pharmacol.* **212**, 101-103.
- Kalina, M. y Socher, R. (1990) *J. Histochem. Cytochem.* **38**, 483-492.
- Kato, T., Lee, S., Ono, S., Agawa, Y., Aoyagi, H., Ohno, M. y Nishino, N. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1063**, 191-196.
- Katyal, S.L., Singh, G. y Locker, J. (1992) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **6**, 446-452.
- Keller, A., Eistetter, H.R., Voss, T. y Schäffer, K.P. (1991) **277**, 493-499.
- Keough, K.M.W., Farrell, E., Cox, M., Harrell, G. y Taeusch, H.W.Jr (1985) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **63**, 1043-1051.
- Keough, K.M.W., Hawco, M.W., Parsons, C.S. (1988) *Biochem. Cell. Biol.* **66**, 405-417.
- Keough, K.M.W., Simatos G., Pérez-Gil, J., Nag, K., Allwood, L.A. y Morrow, M.R. (1992) *Thin. Solid Films* **210/211**, 720-722.
- Khoor, A., Gray, M.E., Hull, W.M., Whitsett, J.A. y Stahlman, M.T. (1993) *J. Histochem. Cytochem.* **41**, 1311-1319.
- Killian, J.A., Keller, R.C.A., Struyvé, de Kroon, A.I.P.M, Tommassen, J. y de Kruijff, B. (1990) *Biochemistry* **29**, 8131-8137.
- King, R.J. (1984) en *Pulmonary Surfactant* (Eds.: Robertson, B., Van Golde, L.M.G., Batenburg, J.J.) pp1,15, Elsevier, Amsterdam.
- King, R.J. y McBeth, M.C. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **557**, 86-101.

- King, R.J. y Martin, H. (1980) *J. Appl. Physiol.* **43**, 812-820.
- King, R.J. y McBeth, M.C. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **647**, 159-168.
- King, R.J., Carmichael, M.C., Horowitz, P.M. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 10672-10680.
- King, R.J., Phillips, M.C., Horowitz, P.M. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **879**, 1-13.
- King, R.J., Simon, D., Horowitz, P.M. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **1001**, 294-301.
- Kliwer, M., Fram, E.K., Brody, A.R. y Young, S.L. (1985) *Exp. Lung Res.* **9**, 351-361.
- Kobayashi, T., Robertson, B., Grossman, G., Nitta, K., Curstedt, T. y Suzuki, Y. (1992) *Acta Paediatr.* **81**, 665-671.
- Koppel, D.E. (1972) *J. Chem. Physic.* **67**, 4814-4820.
- Korfhagen, T.R., Glasser, S.W., Bruno, M.D., McMahan, M.J., Clarck, J.C. y Whitsett, J.A. (1990) *Am. Rev. Resp. Dis.* **141**, A696.
- Korfhagen, T.R., Glasser, S.W., Bruno, M.D., McMahan, M.J. y Whitsett, J.A. (1991) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **4**, 463-469.
- Korfhagen, T.R., Bruno, M.D., Glasser, S.W., Ciruolo, P.J., Whitsett, J.A., Lattier, D.L., Wikenheiser, K.A. y Clarck, J.C. (1992) *Am. J. Physiol.* **263**, L546-L554.
- Kuan, S.F., Rust, K y Crouch, E. (1992) *J. Clin. Invest.* **90**, 97-106.
- Kuroki, Y., Mason, R.J. y Voelker, D.R. (1988 a) *J. Biol. Chem.* **263**, 3388-3394.
- Kuroki, Y., Mason, R.J. y Voelker, D.R. (1988 b) *J. Biol. Chem.* **263**, 17596-17602.
- Kuroki, Y., Mason, R.J. y Voelker, D.R. (1988 c) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5566-5570.
- Kuroki, Y. y AKino, T. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 3068-3073.
- Kuroki, Y., Shiratori, M., Murata, Y. y Akino, T. (1991 a) *Biochem. J.* **279**, 115-119.
- Kuroki, Y., Shiratori, M., Murata, Y. y Akino, T. (1991 b) *Biochem. J.* **279**, 115-119.
- Kuroki, Y., Gasa, S., Ogasawara, Y., Shiratori, M., Makita, A. y Akino, T. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187** (2), 963-969.
- Ladbroke, B.D. y Chapman, D. (1969) *Chem. Phys. Lipids* **3**, 304-367.
- Laemli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
- LaForce, F.M., Kelly, W.J. y Huber, G.L. (1973) *Am. Rev. Respir. Dis.* **108**, 784-790.
- Lakowicz, J.R. (1983) *Principles of Fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, New York and London.
- Lau, M. y Keough, K.M.W. (1981) *Can. J. Biochem.* **59**, 208-219.
- Lehrer, S.S. (1971) *Biochemistry* **10**, 3254-3263.
- Lecerf, J., Fouilland, L. y Gagniarre, J. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **918**, 48-59.
- Lichtenberg, D., Romero, G., Menashe, M. y Biltonen, R.L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 5334-5340.

- Liechty, E.A., Donovan, E., Purohit, D., Gilhooly, J., Feldman, B., Noguchi, A., Denson, S.E., Sehgal, S.S., Gros, I., Stevens, D., Ikegami, M., Zachman, R.D., Carrier, S.T., Gunkel, J.H. y Gold, A.J. (1991) *Pediatrics* **88** (1), 19-28.
- Liley, H.G., Ertsey, R., Gonzales, L.W., Odom, M.W., Hawgood, S., Dobbs, L.G. y Ballard, P.L. (1988). *Biochim. Biophys. Acta* **961**, 86-95.
- Liley, H.G., White, R.T., Warr, R.G., Benson, B.J., Hawgood, S. y Ballard, P.L. (1989) *J. Clin. Invest.* **83**, 1191-1197.
- Lim, B.L., Lu, J. y Reid, K.B.M. (1993) *Immunology* **78**, 159-165.
- Loeb, J.A. y Drickamer, K. (1988) *J. Biol. Chem.* **263** (20), 9752-9760.
- Longo, M.L., Bisagno, A.M., Zasadzinski, J.A.N. y Waring (1993) *Science* **261**, 453-456.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lu, J., Willis, C. y Reid, K.B.M. (1992) **284**, 795-802.
- Lumb, R.H. (1989) *Am. J. Physiol.* **257**, L190-L194.
- Magoon, M.W., Wright, J.R., Baritussio, A., Williams, M.C., Goerke, J., Benson, B.J., Hamilton, R.L. y Clements, J.A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **750**, 18-31.
- Malhotra, R. y Sim, R.B. (1989) *Biochem. J.* **218**, 625-631.
- Malhotra, R., Thiel, R., Reid, K.B.M. y Sim, R.B. (1990) *J. Exp. Med.* **172**, 955-959.
- Malhotra, R., Haurum, J., Thiel, S. y Sim, R.B. (1992) *Eur. J. Immunol.* **22**, 1437-1445.
- Malhotra, R., Laursen, S.B., Willis, A.C. y Sim, R.B. (1993) *Biochem. J.* **293**, 15-19.
- Manz-Keinke, H., Plattner, H. y Shlepper-Schäfer, J. (1991) *Eur. J. Cell Biol.* **57**, 95-100.
- Marino, P.A. y Rooney, S.A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **664**, 389-396.
- Mason, R.J. y Williams, M.C. (1991) *The Lung: Scientific Foundations*. Ed R.G. Crystal, Raven Press, NY, 235-246.
- Massaro, D., Clerck, L. y Massaro, G.D. (1982) *Am. J. Physiol.* **243**, C-39-C45.
- Mathialagan, N. y Possmayer, F. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1045**, 121-127.
- Mc Lean, L.R., Lewis, J.E., Hagaman, K.A., Owen, T.J. y Jackson, R.L. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1166**, 31-38.
- McMurchie, E.J., Teubner, J.K. y Gibson, R.A. (1983) *Comp. Biochem. Physiol.* **74A**, 295-299.
- McNeely, T.B. y Coonrod, J.D. (1993) *J. Infect. Dis.* **167**, 91-97.
- Menestrina, G., Pederzoli, C., Forti, S. y Gambale, F. (1991) *Biophys. J.* **60**, 1388-1400.
- Miles, P.R., Ma, Y.C. y Bowman, A.L. (1988) *J. Appl. Physiol.* **64**, 2474-2481.
- Moore, K.J., D'Amore-Bruno, M.A., Korfhagen, T.R., Glasser, S.W., Whitsett, J.A., Jenkins, N.A. y Copeland, N.G. (1992) *Genomics* **12**, 338-393.



- Morrow, M.R., Pérez-Gil, J., Simatos, G., Boland, C., Stewart, J., Absolom, D., Sarin, V. y Keough, K.M.W. (1993) *Biochemistry* **32**, 4397-4402.
- Murata, Y., Kuroki, Y. y Akino, T. (1993) *Biochem. J.* **291**, 71-76.
- Nicholas, T.E. y Barr, H.A. (1983) *Respir. Physiol* **52**, 69-83.
- Nielson, D.W. y Lewis, M.B. (1988) *Pediatr. Res.* **24**, 322-325.
- Nieman, G.F., Hakin, T.S., Bredenberg, C.E. (1988) *J. Appl. Physiol.* **58**, 129-136.
- Nijssen, J.G. y Van den Bosch, H. (1986 a) *Biochim. Biophys. Acta* **875**, 450-457.
- Nijssen, J.G. y Van den Bosch, H. (1986 b) *Biochim. Biophys. Acta* **875**, 458-464.
- Notter, R.H. (1984) en *Pulmonary Surfactant* (Eds.: Robertson, B., Van Golde, L.M.G. y Batenburg, J.J.) pp.17-65., Elsevier, Amsterdam.
- Notter, R.H. (1988) *Semin. Perinatol.* **12**, 180-212.
- Nowak, M.W. y Berman, H.A. (1991) *Biochemistry* **30**, 7642-7651.
- Oakley, B.A., Kirsch, D.R. y Morris, N.R. (1980) *Anal. Biochem.* **105**, 361-363.
- O'Neill, S., Lesperance, E. y Klass, D.J. (1984) *Am. Rev. Respir. Dis.* **130**, 225-230.
- Oosterlaken-Dijksterhuis, M.A., Haagsman, H.P., Van Golde, L.M.G. y Demel, R.A. (1991 a) *Biochemistry* **30**, 8276-8281.
- Oosterlaken-Dijksterhuis, M.A., Van Eijk, M., Van Buel, B.L.M., Van Golde, L.M.G. y Haagsman, H.P. (1991 b) *Biochem. J.* **274**, 115-119.
- Oosting, R.S., Van Greevenbroek, M.M.J., Verhoef, J., Van Golde, L.M.G. y Haagsman, H.P. (1991) *Am. J. Physiol* **261**, L77-L83.
- O'Reilly, M.A., Noguee, L. y Whitsett, J.A. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **969**, 176-184.
- O'Reilly, M.A., Weaver, T.E., Pilot-Matias, T.J., Sarin, V.K., Gazdar, A.F. y Whitsett, J.A. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **1011**, 140-148.
- Parker, M.W., Tucker, A.D., Tsernoglou, D. y Pattus, F. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 126-129.
- Pastrana, B., Mautone, A.J. y Mendelsohn, R. (1991) *Biochemistry* **30**, 10058-10064.
- Pattle, R.E. (1955) *Nature (Lond.)* **175**, 1125-1126.
- Peerschke, E.I.B., Malhotra, R., Ghebrehiwet, B., Reid, K.B.M., Willis, A.C. y Sim, R.B. (1993) *J. Leukocyte Biol.* **53**, 179-184.
- Pérez-Gil, J., Tucker, J. y Simatos, G. (1992 a) *Biochem. Cell Biol.* **70**, 332-338.
- Pérez-Gil, J., Nag, K., Taneva, S. y Keough, K.M.W. (1992 b) *Biophys. J.* **63**, 197-204.
- Pérez-Gil, J., Cruz, A. y Casals, C. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **116**, 261-270.
- Persson, A., Rust, K., Chang, D., Moxley, M., Longmore, W. y Crouch, E. (1988) *Biochemistry* **27**, 8576-8584.

- Persson, A., Chang, D., Rust, K., Moxley, M., Longmore, W. y Crouch, E. (1989) *Biochemistry* **28**, 6361-6367.
- Persson, A., Chang, D. y Crouch, E. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**(10), 5755-5760.
- Pettenazzo, A., Jobe, A.H., Humme, J., Seidner, S. e Ikegami, M. (1988) *J. Appl. Physiol.* **65**, 2151-2155.
- Phelps, D.S. y Taeusch Jr., H.W. (1985) *Comp. Biochem. Physiol.* **82B**, 441-446.
- Phelps, D.S. y Floros, J. (1988) *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**, 939-942.
- Phelps, D.S. y Floros, J. (1991) *Exp. Lung Res.* **17**, 985-995.
- Phillips, M.C. y Hauser, H. (1974) *J. Colloid Interface Sci.* **49**, 31-39.
- Pigault, C., Follénus-Wund, A., Lux, B. y Gérard, D. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1037**, 106-114.
- Pilot-Matias, T.J., Kister, S.E., Fox, J.L., Kropp, K., Glasser, S.W. y Whitsett, J.A. (1989) *DNA* **8**, 75-86.
- Pinto, R.A., Wright, J.R., Lesikar, D., Benson, B.J. y Clements, J.A. (1993) *J. Appl. Physiol.* **74**(3), 1005-1011.
- Pison, U., Wright, J.R. y Hawgood, S. (1992) *Am. J. Physiol.* **262**, L412-L417.
- Pool, G.L., Bubacz, D.G., Lumb, R.H. y Mason, R.J. (1983) *Biochem. J.* **215**, 637-642.
- Possmayer, F. (1988) *Am. Rev. Respir. Dis.* **138**, 990-998.
- Post, M., Batenburg, J.J., Schuurmans, E.A.J.M. y Van Golde, L.M.G. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **620**, 317-321.
- Poulain, F.R., Allen, L., Williams, M.C., Hamilton, R.L. y Hawgood, S. (1992) *Am. J. Physiol.* **262**, L730-L739.
- Rannels, S.R., Gallaher, K.J., Wallin, R., Rannels, D.E. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5952-5956.
- Reilly, K.E., Mautone, A.J. y Mendelsohn, R. (1989) *Biochemistry* **28**, 7368-7373.
- Revak, S.D., Merrit, T.A., Degryse, E., Stefani, L., Courtney, M., Hallman, M. y Cochrane, C.G. (1988) *J. Clin. Invest.* **81**, 826-833.
- Rice, W.R. y Singleton, F.M. (1986) *Br. J. Pharmacol.* **89**, 485-491.
- Rice, W.R. y Singleton, F.M. (1987) **91**, 833-838.
- Rice, W.R., Ross, G.F., Singleton, F.M., Dingle, S y Whitsett, J.A. (1987) *J. Appl. Physiol.* **63**, 692-698.
- Rice, W.R., Sarin, V.K., Fox, J.L., Baatz, J., Wert, S. y Whitsett, J.A. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **1006**, 237-245.
- Rice, W.R., Dorn, C.C. y Singleton, F.M. (1990) *Biochem. J.* **266**, 407-413.

- Richman, P.S., Batcher, S. y Catanzaro, A. (1990) *J. Lab. Clin. Med.* **116**, 18-26.
- Rider, E.D., Ikegami, M. y Jobe, A.H. (1990) *J. Appl. Physiol.* **69** (5), 1856-1862.
- Rider, E.D., Pinkerton, K.E. y Jobe, A.H. (1991) *J. Biol. Chem.* **266** (33), 22522-22528.
- Rider, E.D., Ikegami, M. y Jobe, A.H. (1992) *Am. J. Physiol.* **263** L201-L209.
- Rooney, S.A. y Gobran, L.I. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **960**, 98-106.
- Ross, G.F., Notter, R.H., Meuth, J. y Whitsett, J.A. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 14283-14291.
- Ross, G.F., Sawyer, J., O'Connor, y Whitsett, J.A. (1991) *Biochemistry* **30**, 858-865.
- Rouser, G., Siakotos, A.N y Fleisher, S. (1966) *Lipids* **12**, 505-510.
- Rust, K., Grosso, L., Zhang, V., Chang, D, Persson, A., Longmore, W. y Crouch E. (1991) *Arch. Biochim. Biophys.* **290**, 116-126.
- Ryan, R.M., Morris, R.E., Rice, W.R., Ciruolo, G. y Whitsett, J.A. (1989) *J. Histochem. Cytochem.* **37**, 429-440.
- Sano, K., Voelker, D.R. y Mason, R.J. (1987 a) *Biochim. Biophys. Acta* **902**, 317-326.
- Sano, K., Volker, D.R. y Mason, R.J. (1987 b) *Am. J. Physiol.* **253**, C679-C686.
- Sano, K., Fisher, J., Mason, R.J., Kuroki, Y., Schilling, J., Benson, B. y Voelker, D. (1987 c) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**, 367-374.
- Sarin, V.K., Gupta, S., Leung, T.K., Taylor, V.E., Ohning, B.L., Whitsett, J.A. y Fox, J.L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **87**, 2633-2637.
- Sastry, K., Herman, G.A., Day, L., Deignan, E., Bruns, G., Morton, C.C. y Ezekowitz, R.A.B. (1989) *J. Exp. Med.* **170**, 1175-1189.
- Sastry, K. y Ezekowitz, R.A.B. (1993) *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 59-66.
- Schellhase, D.E., Emrie, P.A., Fisher, J.H. y Shannon, J.M. (1989) *Pediatr. Res.* **26**, 167-174.
- Schlame, M, Casals, C., Rustow, B, Rabe, H y Kunze, D. (1988) *Biochem. J.* **253**, 209-215.
- Schneeberger, E.E. (1991) *The Lung: Scientific Foundations* Ed R.G. Crystal, Raven Press, NY, 229-233.
- Schürch, S., Goerke, J. y Clements, J.A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 4698-4702.
- Schürch, S., Goerke, J. y Clements, J.A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3417-3421.
- Schürch, S. (1982) *Respir. Physiol.* **48**, 339-355.
- Schürch, S., Bachofen, H., Goerke, J y Possmayer, F. (1989) *J. Appl. Physiol.* **67**, 2389-2396.
- Schürch, S., Possmayer, F., Cheng, S. y Cockshutt, A. (1992) *Am. J. Physiol.* **263**, 210-L218.
- Sen, A., Hui, S, Mosgrober-Anthony, M., Holm, B.A. y Egan, E.A. (1988) *J. Colloid Interface Sci.* **126**, 355-360.
- Shannon, J.M., Emrie, P.A., Fisher, J.H., Kuroki, Y., Jennings, S.D. y Mason R.J. (1990) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **2**, 183-192.

- Shelley, S.A., Paciga, J.E., y Balis, J.U. (1984) *Lipids* **19**, 857-862.
- Shiffer, K., Hawgood, S., Haagsman, H.P., Benson, B., Clements, J.A. y Goerke, J. (1993) *Biochemistry* **32**, 590-597.
- Shimizu, H., Fisher, J.H., Papst, P., Benson, B.J., Lau, K., Mason, R.J. y Voelker, D.R. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**(3), 1853-1857.
- Simatos, G.A., Forward, K.B., Morrow, M.R. y Keough, K.M.W. (1990) *Biochemistry* **29**, 5807-5814.
- Sitrin, R.G., Ansfield, M.J. y Kaltreider, H.B. (1985) *Exp. Lung Res.* **9**, 85-97.
- Snyder, J.M. y Mendelson, C.R. (1987) *Endocrinology* **120**, 1250-1257.
- Snyder, J.M., Rodgers, H.F., Nielsen, H.C. y O'Brien, J.A. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **1002**, 1-7.
- Somogyi, B. y Lakos, S. (1993) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **18**, 3-16.
- Stahlman, M.T., Gray, M.E. y Whitsett, J.A. (1992) *J. Histochem. Cytochem.* **40**(10), 1471-1480.
- Standford, G.L. y Frosolono, M.F. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **665**, 339-344.
- Strayer, D.S., Yang, S. y Jerng, H.H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268** (25), 18679-18684.
- Stults, J.T., Griffin, P.R., Lesikar, D.D., Naidu, A., Moffat, B y Benson, B. (1991) *Am. J. Physiol.* **261**, L118-L125.
- Sugahara, K., Iyama, K-I., Sano, K. y Morioka, T. (1992) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **6**, 307-314.
- Suzuki, Y., Fujita, Y. y Kogishi, K. (1989) *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**, 75-81.
- Takahashi, A. y Fujiwara, T. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**, 527-532.
- Takahaski, A., Waring, A.J., Amirkhanian, J., Fan, B. y Taeusch, H.W. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1004**, 43-49.
- Tanaka, Y, Takei, T., Aiba, T., Masuda, K., Kuichi, A. y Fujiwara, T. (1986) *J. Lipid Res.* **27**, 475-485.
- Taylor, L., Polgar, P., McAteer, J.A. y Douglas, W.H.J. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **572**, 502-509.
- Teale, F.W.J. (1969) *Biochem. J.* **76**, 381-388.
- Teale, F.W.J. y Weber G. (1957) *Biochem. J.* **65**, 476-482.
- Tenner, A.J., Robinson, S.L., Borchelt, J. y Wright, J.R. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**(23), 13923-13928.
- Thet, L.A., Clerch, L, Massaro, G.D. y Massaro, D. (1979) *J. Clin. Invest.* **64**, 600-608.
- Thiel, S. y Reid, K.B.M. (1989) *FEBS Lett.* **250**, 78-84.

- Thorkelsson, T., Ciruolo, G.M., Ross, G.F., Whitsett, J.A. y Morris, R.E. (1992) *40*(5), 643-649.
- Tierney, D.F. (1989) *Am. J. Physiol.* **257**, L1-L12.
- Vandenbussche, G., Clercx, A., Clercx, M., Curstedt, T., Jörnvall, H. y Ruyschaert, J.M. (1992 a) *Biochemistry* **31**, 9196-9176.
- Vandenbussche, G., Clercx, A., Curstedt, T., Johansson, J., Jörnvall, H. y Ruyschaert, J.M. (1992 b) *Eur. J. Biochem.* **203**, 201-209.
- Van Iwaarden, F., Welmers, B., Verhoef, J., Haagsman, H.P. y Van Golde, L.M.G. (1990) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2**, 91-98.
- Van Iwaarden, F., Van Strijp, J.A.G., Ebskamp, M.J.M., Weelmers, A.C., Verhoef, J. y Van Golde, L.M.G. (1991) *Am. J. Physiol.* **261**, L204-L209.
- Van Iwaarden, F., Shimizu, H., Van Golde, P.H.M., Voelker, D. y Van Golde, L.M.G. (1992 a) *Biochem. J.* **286**, 5-8.
- Van Iwaarden, F., Van Strijp, J.A.G., Ebskamp, M.J.M., Weelmers, A.C., Verhoef, J. y Van Golde, L.M.G. (1992 b) **261**, L204-L209.
- Van Iwaarden, F., Van Strijp, J.A.G., Visser, H., Haagsman, H.P., Verhoef, J. y Van Golde, L.M.G. (1992 c) *J. Biol. Chem.* **267** (35), 25039-25043.
- Van Golde, L.M.G. y Casals, C. (1991) *The Lung: Scientific Foundations*. Ed. R.G. Crystal, Raven Press, NY, 25-31.
- Van Golde, L.M.G., Batenburg, J.J. y Robertson, B. (1994) *NIPS* **9**, 13-20.
- Venkitaraman, A.R., Hall, S.B., Whitsett, J.A. y Notter, R.H. (1990) *Chem. Phys. Lipids* **56**, 185-194.
- Vilallonga, F. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* **163**, 290-300.
- Von Neergaard, K (1929) *Z. Gesamte Exp. Med.* **66**, 373-394.
- Voorhout, W.F., Veenendaal, T., Haagsman, H.P., Verkleij, A.J., Van Golde, L.M.G. y Geuze, H.J. (1991) *J. Histochem. Cytochem.* **39** (10), 1331-1336.
- Voorhout, W.F., Veenendaal, T., Haagsman, H.P., Weaver, T.E., Whitsett, J.A., Van Golde, L.M.G. y Geuze, H.J. (1992 a) *Am. J. Physiol.* **263**, L479-L486.
- Voorhout, W.F., Veenendaal, T., Kuroki, Y., Ogasawara, Y., Van Golde, L.M.G. y Geuze, H.J. (1992 b) *J. Histochem. Cytochem.* **40**(10), 1589-1597.
- Voss, T., Eistetter, H. y Schäffer, K (1988) *J. Mol. Biol.* **201**, 219-227.
- Voss, T., Schäffer, K.P., Nielsen, P.F., Schäffer, A., Maier, C., Hannapel, E., Maaßen, J., Landis, B., Klemm, K. y Przybylski, M. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1138**, 261-267.

- Walker, S.R., Williams, M.C. y Benson, B.J. (1986) *J. Histochem. Cytochem.* **34**, 1137-1148.
- Wallin, R., Seaton, M. y Martin, L.F. (1988) *Biochem. J.* **252**, 851-856.
- Warburton, D., Buckley, S. y Cosico, L. (1989) *J. Appl. Physiol.* **66**(2), 901-905.
- Waring, D., Taeusch, W., Bruni, R., Amirkhanian, J., Fan, B., Stevens, R. y Young, J. (1989) *Peptide Res.* **2**, 308-313.
- Waring, D., Fan, B., Nguyen, T., Amirkhanian, J. y Taeusch, H.W. (1990) *Prog. Resp. Res.* **25**, 343-346.
- Warr, R.G., Hawgood, S., Buckley, D.I., Crisp, T.M., Schilling, J., Benson, B.J., Ballard, P.L., Clements, J.A. y White, R.T. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7915-7919.
- Weaver, T.E. y Whitsett, J.A. (1989) *Am. J. Physiol.* **257**, L100-L108.
- Weaver, T.E. y Whitsett, J.A. (1991) *Biochem. J.* **273**, 249-264.
- Weaver, T.E. y Voorhout, W. (1994) *Prog. Respir. Res. Basel, Karger*, **27**, 51-57.
- Weaver, T.E., Hull, W.M., Ross, G. y Whitsett, J.A. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **869**, 330-336.
- Weaver, T.E., Sarin, V.K., Sawtell, N., Hull, W.M.Y. y Whitsett, J.A. (1988) *J. Appl. Physiol.* **65**, 982-987.
- Weaver, T.E., Lin, S., Bogucki, B. y Dey, C. (1992) *Am. J. Physiol.* **263**, L95-L103.
- Webb, D.S.A. y Jeska, E.L. (1986) *J. Leukoc. Biol.* **40**, 55-64.
- Weibel, E.R. y Bachofen, H. (1987) *NIPS* **2**, 72-75.
- Weibel, E.R. y Crystal, R.G. (1991) *The Lung: Scientific Foundations* Ed. R.G. Crystal, Raven Press, NY, 369-379.
- Weiss, I.W., Kahn, R., Foume, R., Drickamer, K., Henrickson, W.A. (1991) *Science* **254**, 1608-1615.
- Wilsher, M.L., Hughes, D.A. y Haslam, P.L. (1988) *Thorax* **43**, 354-359.
- Wilsher, M.L., Parker, D.J. y Haslam, P.L. (1990) *Thorax* **45**, 3-8.
- White, D.A. (1973) en *Form and Function of Phospholipids* (Eds: Ansell, G.B., Dawson, R.M., Hawthorn, J.N.) pp. 441-482, Elsevier, Amsterdam.
- White, R.T., Damm, D., Miller, J., Spratt, K., Schilling, J., Hawgood, S., Benson, B. y Cordell, B. (1985) *Nature* **317**, 361-363.
- Whitsett, J.A. (1991) *The Lung: Scientific Foundations*. Ed R.G. Crystal, Raven Press, NY, 1723-1733.
- Whitsett, J.A., Ross, G., Weaver, T.E., Rice, W., Dion, C. y Hull, W. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 15273-15279.

- Whitsett, J.A., Weaver, T.E., Clark, J.C., Sawtell, N., Glasser, S.W., Korfhagen, T.R. y Hull, W.M. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 15618-15623.
- Williams, M.C. (1977) *J. Cell Biol.* **72**, 260-277.
- Williams, M.C. (1978) *J. Ultrastructure Res.* **64**, 352-361.
- Williams, M.C. (1982) *Exp. Lung Res.* **4**, 37-46.
- Williams, M.C. (1987) *Am. Rev. Respir. Dis.* **135**, 744-746.
- Williams, M.C., Hawgood S., Schenk D.B., Lewicki, J., Phelps, M.N. y Benson, B. (1988) *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**, 399-405.
- Williams M.C., Hawgood, S. y Hamilton, R.L. (1991) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **5**, 41-50.
- Wilson, T.A. y Bachofen, H. (1982) *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol.* **52**, 1064-1070.
- Wintergerst, E., Manz-Keinke, H., Plattner, H. y Schlepper-Shäfer, J. (1989) *Eur. J. Cell Biol.* **50**, 291-298.
- Wirtz, H.R.W. y Dobbs, L.G. (1990 a) *Science* **250**, 1266-1269.
- Wirtz, H.R.W. y Dobbs, L.G. (1990 b) *Prog. Respir. Res.* **25**, 285-287.
- Wirtz, H.R.W. y Schmidt, M. (1992) *Clin. Invest.* **70**, 3-13.
- Wright, J.R. (1990) *Am. J. Physiol.* **259** L1-L12.
- Wright, J.R., Benson, B.J., Williams, M.C. y Clements, J.A. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **791**, 320-332.
- Wright, J.R. y Clements, J.A. (1987) *Am. Rev. Respir. Dis* **135**, 426-444.
- Wright, J.R., Wager, R.E. y Hawgood, S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 2888-2894.
- Wright, J.R., Borchelt, J.D. y Hawgood, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5410-5414.
- Wright, J.R. y Dobbs, L.G. (1991) *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 395-414.
- Wright, J.R. y Youmans, D.C. (1993) *Am. J. Physiol.* **264**, L338-L344.
- Xu, J., Richardson, C., Ford, C., Spencer, T., Li-juan, Y., Mackie, G., Hammond, G. y Possmayer, F. (1989) *Biochem. Biophys. Res Commun.* **160**(1), 325-332.
- Young, S.L., Wright, J.R. y Clements, J.A. (1989) *J. Appl. Physiol.* **66**, 1336-1342.
- Young, S.L., Fram, E.K., Larson, E. y Wright, J.R. (1993) *Am. J. Physiol.* **265**, L19-L26.
- Yu, S-H. y Possmayer, F. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **961**, 337-350.
- Yu, S-H. y Possmayer, F. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1046**, 233-241.
- Zimmerman, P.E., Voelker, D.R., McCormack, F.X., Paulsruud, J.R. y Martin II, W.J. (1992) *J. Clin. Invest.* **89**, 143-149.